

PATENT
Attorney Docket No. 205970

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of:

Baumann et al.

Art Unit: 1646

Application No. 09/640,582

Examiner: N.S. Basi

Filed: August 17, 2000

For: SEQUENCES OF AN I_H ION CHANNEL AND USE THEREOF

CLAIM OF PRIORITY

Commissioner for Patents
Box SEQUENCE
P.O. Box 2327
Arlington, VA 22202

Dear Sir:

In accordance with the provisions of 35 USC 119, Applicants claim the priority of the application or the applications (if more than one application is set out below):

Application No. 19806581.7, filed in Germany on February 17, 1998.

A certified copy of the above-listed priority document is enclosed.

Respectfully submitted,

Carol Larcher, Reg. No. 35,243
LEYDIG, VOIT & MAYER, LTD.
Two Prudential Plaza, Suite 4900
180 North Stetson
Chicago, Illinois 60601-6780
telephone: (312) 616-5600
facsimile: (312) 616-5700

Date: February 27, 2003

#12
MgJ
3/19/03



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 198 06 581.7

Anmeldetag: 17. Februar 1998

Anmelder/Inhaber: Forschungszentrum Jülich GmbH, Jülich/DE

Bezeichnung: Sequenzen eines I_h -Ionenkanals und deren Verwendung

IPC: C 07 K, A 61 K, C 07 H

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 29. Januar 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag



CERTIFIED COPY OF

Sequenzen eines I_h -Ionenkanals und deren Verwendung

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Nukleinsäure, vorzugsweise eine DNA, die mindestens einen Teil der Sequenz eines I_h -Ionenkanals umfaßt. Diese Sequenz kann z.B. von einer humanen DNA, einer Ratten-DNA, einer Rinder-DNA einer *Drosophila-melanogaster*-DNA oder einer Seeigel-DNA abgeleitet sein. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung ein mRNA-Molekül, das die entsprechenden Sequenzen umfaßt. Die Erfindung betrifft außerdem ein Polypeptid bzw. Protein, das die entsprechende abgeleitete Aminosäuresequenz umfaßt.

Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung einer oder mehrerer der oben genannten Sequenzen für ein Screeningverfahren und/oder Diagnoseverfahren sowie die dafür notwendigen Kits.

Schließlich betrifft die Erfindung die Verwendung einer oder mehrerer der obenstehenden Sequenzen für die Behandlung und/oder Prophylaxe von Herz/Kreislaufstörungen sowie Schlafstörungen.

Die große Vielfalt der Funktionen des Nervensystems wird wesentlich bestimmt durch fein abgestimmte Wechselwirkungen zwischen den intrinsischen Eigenschaften der Neuronen und den synaptischen Verbindungen. Die den Neuronen und Synapsen eigenen elektrophysiologischen Eigenschaften wiederum werden bestimmt von der Lokalisierung und Dichte der spannungs- und liganden-gesteuerten Ionenkanäle, die den Fluß von Ionenströmen über die neuronale Plasmamembran regulieren und die durch eine große Vielzahl von Transmittersubstanzen und intrazellulären Botensystemen gesteuert werden (Hille, 1992)

Im Hinblick auf die spezifische Aktivität, die von den neuronalen Elementen erwartet wird, ist es nicht erstaunlich, daß Neuronen ein großes Repertoire an Ionenkanälen besitzen, einschließlich der klassischen Kanäle, die spannungsabhängige Natrium(Na^+)- und Kalium(K^+)- Ströme während eines Aktionspotentials


erzeugen (Hodgkin und Huxley, 1952) wie auch eine Anzahl ungewöhnlicher Ionenleitwerte (Llinás, 1988).

Ein ursprünglich von Ito und Mitarbeitern (Araki et al., 1962; Ito und Oshima, 1965) in Motoneuronen von Katzen entdeckter, ungewöhnlicher intrinsischer Mechanismus erwies sich als langsame Relaxation der Potentialveränderung, die durch hyperpolarisierenden Strom induziert wird, was zu einem nicht ohmschen Verhalten der Strom/Spannungs(I/V)-Beziehung in hyperpolarisierender Richtung führt. Der zugrunde liegende, zeitabhängige Membranstrom wurde zunächst in Photorezeptoren der Stäbchen als Cäsium(Cs^+)-empfindlicher, nach innen gerichteter Strom charakterisiert, der durch Hyperpolarisierung ausgelöst wird und die Membran depolarisieren kann. Dies führt zu der typischen Abfolge einer anfänglichen transienten Hyperpolarisierung durch Belichtung, gefolgt von einer langsamen Depolarisation (Attwell und Wilson, 1980; Bader et al., 1982; Bader et al., 1979; Fain et al., 1978).


Der Strom in den Photorezeptoren wurde als I_h bezeichnet, da er durch eine Hyperpolarisierung aktiviert wird. Ungefähr zur selben Zeit wurde ein ähnlicher Ionenstrom im Herz, in den Schrittmacherzellen des Sinusknoten, entdeckt sowie in den Purkinje-Fasern des Säugerherzens (Brown und DiFrancesco, 1980; Brown et al., 1979; DiFrancesco, 1981a; DiFrancesco, 1981b; Yanagihara und Irisawa, 1980) und es wurde deutlich, daß der langsame, nach innen gerichtete Strom von Natrium- und Kaliumionen getragen wird. Dieser Strom wurde als "funny"-Strom bezeichnet (I_f), um sein ungewöhnliches Verhalten zu unterstreichen, d.h. die Tatsache, daß es sich um einen nach innen gerichteten Strom handelt, der durch Hyperpolarisierung aktiviert wird und den zuvor beschriebenen K^+ -Leitwert I_{K2} auf kuriose Weise ähnlich war. Es besteht ein wachsendes Interesse an diesem Strom, da er z.B. an der Erzeugung und Steuerung spontaner Aktivität des Herzens beteiligt ist.

Es wurden weitere Beweise für das Vorhandensein eines entsprechenden Stroms in zentralen Neuronen gefunden und erstmalig von Halliwell und Adams (1982)

aufgeführt. Sie beobachteten in Pyramidenzellen des Hippocampus nach Hyperpolarisierung einen langsamen, nach innen gerichteten Strom, der als "queer"-Strom (I_q) bezeichnet wurde. In der Folgezeit wurden Ströme mit ähnlichen Eigenschaften in einer großen Vielzahl von neuronalen und nicht neuronalen Zellen gefunden und dieser hyperpolarisations-aktivierte Strom wurde schließlich als allgegenwärtiges Phänomen in Zellen des Nervensystems erkannt. Die Bezeichnung als " I_h " hat sich für die Beschreibung dieses Stroms in der Zwischenzeit durchgesetzt.



Obwohl man zunächst annahm, daß die Aktivität der jeweiligen I_h -Kanäle nicht moduliert wird, zeigen immer mehr Daten, daß die I_h -Kanäle wichtige Ziele für Neurotransmitter und Botensysteme sind, was ihre wichtige physiologische Rolle bei der Steuerung zellulärer elektrischer Aktivitäten unterstreicht.



Mittlerweile weiß man, daß I_h signifikant zum Ruhepotential beiträgt, eine überschüssige Hyperpolarisierung begrenzt, die Form von Aktionsmustern (firing pattern) bestimmt und in der Erzeugung rhythmischer Oszillationen des Membranpotentials beteiligt ist. I_h -Ströme besitzen einige besondere Eigenschaften, die sie von anderen spannungsgesteuerten Ionenkanälen unterscheiden. Wie spannungsgesteuerte Na^+ , Ca^{2+} und bestimmte K^+ -Ströme, zeigen sie eine steile Spannungsabhängigkeit und aktivieren mit einem sigmoiden Zeitverlauf; sie werden jedoch durch Hyperpolarisation aktiviert und de-aktivieren mit einer sigmoiden Kinetik.

Die Aktivierung bei negativen Potentialen und die Blockierung durch Cs^+ -Ionen erinnert an einwärts gleichrichtende K^+ -Kanäle. Viele Eigenschaften von I_h unterscheiden sich jedoch deutlich von dieser K^+ -Kanalfamilie: Die Aktivierungskinetik ist langsamer, der Aktivierungsbereich ist positiver und unabhängig von der extrazellulären K^+ -Konzentration, der Leitwert ist im wesentlichen resistent gegen extrazelluläre Ba^{2+} -Ionen und die I_h -Kanäle sind nicht nur für K^+ -Ionen, sondern auch für Na^+ -Ionen permeabel. Anders als andere Kationenkanäle, wie z.B. li-

gandengesteuerte Kationenkanäle, sind die I_h -Kanäle sehr selektiv für Na^+ - und K^+ -Ionen und sie besitzen eine steile, spannungsabhängige Steuerung.

Besonders wichtig für die gegenwärtige Forschung ist die Beteiligung der I_h -Kanäle an der Schrittmacherfunktion im Herzmuskel. Die Schrittmacheraktivität im Herzen ist auf spezialisierte Myozyten zurückzuführen, die in bestimmten Bereichen des Herzens (*sinus venosus*) lokalisiert sind, und die durch ihre Fähigkeit charakterisiert sind, spontan zu schlagen, selbst wenn sie vom Rest des Herzmuskels getrennt sind. In Schrittmacherzellen des Sinusknotens bei Säugern ergibt sich die spontane Aktivität aus einer typischen Phase ihres Aktionspotentials, der langsamen diastolischen Depolarisierung. Während dieser Phase, die der Diastole des Herzkontraktionszyklusses entspricht, depolarisiert die Membran nach der Beendigung des Aktionspotentials wieder langsam, bis der Schwellenwert für die Ausbildung eines neuen Aktionspotentials erreicht wird. So ist die diastolische Depolarisierung für die Initiierung des rhythmischen Verhaltens verantwortlich und charakterisiert Aktionspotentiale des Sinusknotens und anderer spontan aktiver Kardiozyten.

Neben der Erzeugung rhythmischer Aktivität ist die diastolische (oder Schrittmacher-) Depolarisierung an der Steuerung der Herzschlagfrequenz durch autonome Neurotransmitter beteiligt. Es ist bekannt, daß die Stimulierung des sympathischen und parasympathischen Nervensystems zur Beschleunigung bzw. Verlangsamung des Herzschlags führt.

In der Zwischenzeit ist bekannt, daß die I_h -Kanäle an dieser Schrittmacherfunktion beteiligt sind. Der I_h -Strom des Sinusknotens ist ein unspezifischer Kationenstrom, normalerweise getragen durch Na^+ und K^+ , der langsam nach Hyperpolarisierung in einem Spannungsbereich aktiviert, der denjenigen der diastolischen Depolarisierung umfaßt. Die I_h -Merkmale sind gut geeignet, um einen Depolarisierungsprozeß zu erzeugen als Reaktion auf eine Hyperpolarisierung in einem Spannungsbereich bei dem der I_h -Kanal aktiviert wird.

Es ist bis jetzt jedoch noch nicht gelungen, Sequenzen von Genen zu identifizieren, die für I_h -Ionenkanäle kodieren. Ferner stand bisher nicht genügend Kanalprotein zur Verfügung, um dieses biochemisch zu charakterisieren. Schließlich war bisher die pharmakologische Charakterisierung von I_h -Kanälen äußerst schwierig, weil die I_h -Ströme an ganzen Zellen, die zusätzliche K^+ - und Na^+ -selektive Leitfähigkeiten besitzen, identifiziert und von den anderen Strömen experimentell isoliert wurden.

Es war daher eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, die Nukleinsäure anzugeben, deren Verwendungsmöglichkeiten aufzuzeigen, sowie das Protein in einem funktionellen Zustand und in ausreichender Menge für biochemische Analysen und pharmazeutische Anwendungen bereitzustellen.

Diese Aufgabe wird durch den Gegenstand der unabhängigen Ansprüche gelöst. Vorteilhafte Weiterbildungen sind in den abhängigen Ansprüchen angegeben.

Die im folgenden verwendeten Begriffe haben folgende Bedeutung:

Unter " I_h -Ionenkanal" sollen hier solche Ionenkanäle verstanden werden, die (1) sich durch Hyperpolarisation öffnen und bei positiveren Spannungswerten ($V_m \geq -10$ mV) geschlossen sind; (2) deren Aktivierung und De-Aktivierung mit einem relativ langsamen, sigmoidalen Zeitverlauf erfolgt; (3) nicht nur K^+ -Ionen, sondern auch Na^+ -Ionen leiten; (4) durch 0,1 - 3 mM extrazelluläres Cs^+ fast vollständig blockiert werden und (5) durch zyklische Nukleotide, insbesondere cyclo AMP und cyclo GMP direkt moduliert werden.

Unter "stringenten Bedingungen" wird eine Hybridisierung in 0,1-5 x SSC, vorzugsweise 1-2 x SSC, bei 60-70°C, vorzugsweise 65°C, verstanden.

Unter "Bedingungen niedriger Stringenz" wird eine Hybridisierung mit 0,1-5 x SSC, vorzugsweise 1-2 x SSC bei 50-60°C, vorzugsweise bei 55°C, verstanden.

"Teile" des I_h-Ionenkanals bedeutet einen Abschnitt der Proteinsequenz, der als antigene Determinante geeignet ist, beispielsweise ein Abschnitt von mindestens 6 Aminosäuren. Als Teil werden auch Abschnitte angesehen, die in Form von Domänen auftreten, wie beispielsweise die Abschnitte, S1, S2 etc., wie in Abbildung 1A angegeben. Mit umfaßt sind Abschnitte des Ionenkanals, die sich von den in Seq. ID Nr. 1 bis 11 angegebenen DNA-Sequenzen, die unter Verwendung des IUPAC-Kodes angegeben sind, durch Aminosäureaustausche, Deletionen und Additionen ableiten unter Beibehaltung der biologischen Funktion.

"Teil" davon im Zusammenhang mit der Nukleinsäure bedeutet ein mindestens 6 Nukleotide langes Fragment, vorzugsweise 12 Nukleotide, besonders bevorzugt 18 Nukleotide lang. Der Teil ist geeignet, über Oligonukleotidhybridisierung spezifisch (selektiv) mit der korrespondierenden Gesamtsequenz zu hybridisieren. Danach ist ein "Teil" der Nukleinsäure ein Abschnitt aus den Sequenzen gemäß Seq. ID Nr. 1 bis 11, der geeignet ist, selektiv mit einer der genannten Sequenzen zu hybridisieren.

"Selektiv" (spezifisch) bedeutet, daß eine Nukleinsäure unter den geeigneten Hybridisierungsbedingungen nur mit einer Nukleinsäure hybridisiert, wie durch eine der Sequenzen nach Seq. ID Nr. 1 bis 11 angegeben, während sie nicht mit einer anderen Nukleinsäure des jeweiligen Wirtsorganismus hybridisiert, mit dem sie üblicherweise assoziiert ist.

"Homologie", wie hierin verwendet, berechnet sich wie folgt: Es werden die Aminosäuren in den miteinander verglichenen Sequenzen oder Sequenzabschnitten gezählt, die entweder an der jeweiligen Position identisch oder ähnlich sind. Diese Zahl wird durch die Gesamtzahl der Aminosäurereste geteilt und mit 100 multipliziert. Daraus ergibt sich ein Prozentsatz der Sequenzähnlichkeit bzw. Homologie. Das unten aufgeführte Beispiel illustriert dies:

TWALFKALSHMLCIGYGKFPPQS
PDAFWWAVVTMTTVGYGDMTPVG

Die Gesamtzahl der miteinander verglichenen Positionen beträgt 23 Reste; es gibt 7 identisch und 6 ähnlich besetzte Aminosäurepositionen. Deshalb ist die Homologie $(7 + 6)/23 \times 100 = 56,5 \%$. Ein Austausch von ähnlichen Aminosäuren wird auch als konservativer Austausch bezeichnet (vgl. Dayhoff et al., 1978).

Gemäß Anspruch 1 wird eine Nukleinsäure bereitgestellt, die mindestens einen Teil der Sequenz eines I_h -Ionenkanals umfaßt. Die hierzu komplementäre Nukleinsäure wird ebenfalls als erfindungsgemäße Ausführungsform betrachtet. Diese Nukleinsäure kann vorzugsweise von einer humanen DNA abgeleitet sein und ist insbesondere dann durch die Sequenzen gemäß Seq. ID Nr. 1, Seq. ID Nr. 10 und Seq. ID Nr. 11 gekennzeichnet.

Vorteilhaft kann die Sequenz auch von einer Ratten-DNA abgeleitet sein, und ist dann insbesondere durch die Seq. ID Nr. 2 sowie Seq. ID Nr. 8 und Seq. ID Nr. 9 gekennzeichnet.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann die Sequenz von einer Rinder-DNA abgeleitet sein und ist dann durch die Sequenzen gemäß Seq. ID Nr. 3 sowie Seq. ID Nr. 6 und Seq. ID Nr. 7 charakterisiert.

Weiterhin bevorzugt kann die Sequenz von einer Seeigel-DNA abgeleitet sein, und ist dann vorzugsweise durch die Sequenz Seq. ID Nr. 4 gekennzeichnet.

Weiterhin bevorzugt kann die DNA von *Drosophila melanogaster* abgeleitet sein. Die vollständige Sequenz ist dann gemäß Seq. ID Nr. 5.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform sind Sequenzen enthalten, die mindestens 80 % Homologie zu einer der Sequenzen mit der Seq. ID Nr. 1 bis 11 aufweisen. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform weist die Sequenz mindestens 90 % Homologie zu einer der Sequenzen bezeichnet mit Seq. ID Nr. 1 bis 11 auf.

Besonders bevorzugt hybridisiert sie unter gering stringenten Bedingungen und noch bevorzugter unter Bedingungen hoher Stringenz mit einer der Sequenzen bezeichnet mit Seq. ID Nr. 1 bis 11.

Von der vorliegenden Erfindung mit erfaßt sind Abwandlungen der Sequenzen gemäß Seq. ID Nr. 1 bis 11, die sich beispielsweise durch die Degeneration des genetischen Kodes, Deletionen, Insertionen, Inversionen und weiterer Mutationen ergeben, wobei vorzugsweise die biologische Eigenschaft des kodierten Kanalproteins oder Teils davon beibehalten wird.

Die Erfindung betrifft ferner ein mRNA-Molekül, das eine Sequenz umfaßt, die mit einer der oben beschriebenen Sequenzen korrespondiert. Entsprechend umfaßt die Erfindung ein Polypeptid, das von der oben genannten Nukleinsäure kodiert wird.

Die oben beschriebenen Sequenzen können für ein Screening-Verfahren oder auch für ein Diagnoseverfahren verwendet werden. In einem Screening-Verfahren ergibt sich durch die Identifizierung der Sequenz des I_h -Kanals die Möglichkeit, die Wirkung von Substanzen auf Ionenkanäle unter Verwendung dieser Sequenzen zu testen.

Ein solches Screening-Verfahren kann beispielsweise die folgenden Schritte umfassen:

- Erzeugung homogener Kanalpräparate, beispielsweise durch Expression der oben genannten Nukleinsäure in einem geeigneten Wirt, wie beispielsweise Oocyten, Säugerzellen etc.,
- Testen von Substanzen an diesen Kanalpräparationen.

Dabei läßt sich durch Messen der Kanalaktivität unter der Einwirkung bzw. Abwesenheit von Testsubstanzen ermitteln, welche Substanzen zur Beeinflussung der Kanäle geeignet sind.

Die Erfindung betrifft auch einen Kit zur Durchführung eines solchen Screening-Verfahrens, das mindestens eine der oben beschriebenen Nukleinsäuren bzw. Polypeptide umfaßt.

Die Sequenzen können auch für ein Diagnoseverfahren verwendet werden, insbesondere für die Erkennung von Herz/Kreislaufstörungen.

In diesem Diagnoseverfahren wird vorzugsweise die Nukleinsäure des Patienten mit einem Sequenzabschnitt einer der oben beschriebenen DNAs und/oder RNAs in Berührung gebracht, so daß ein Signal erhalten wird, das die Anwesenheit und/oder Abwesenheit einer Ionenkanalnukleinsäuresequenz anzeigt. Durch die Wahl geeigneter Proben, z.B. kurzer Oligonukleotide, lassen sich auch Mutationen in den Ionenkanälen der Patienten nachweisen, was wiederum für die Differentialdiagnose hilfreich ist.

Die Erfindung betrifft ferner einen Kit zur Durchführung eines solchen Diagnoseverfahrens, das eine der oben beschriebenen Sequenzen umfaßt.

Es ist außerdem möglich, die oben beschriebenen Sequenzen für eine Behandlung und/oder Prophylaxe von Herz/Kreislaufstörungen sowie Bewußtseinsstörungen und Schmerzzuständen einzusetzen. In einer bevorzugten Ausführungsform können Herz/Kreislaufstörungen behandelt oder frühzeitig erkannt werden, die auf einer Fehlsteuerung des Sinusknotens beruhen. Weiterhin werden bevorzugt Bewußtseinsstörungen erkannt, die auf einer Fehlfunktion cortico-thalamischer Neuronen beruhen. So kann beispielsweise im Rahmen der Gentherapie ein voll funktionsfähiger Ionenkanal, wie von den hierin beschriebenen Nukleinsäuren kodiert, in einen Patienten eingebracht werden, um so einen nicht mehr funktionsfähigen Kanal zu ersetzen.

Schließlich betrifft die Erfindung eine pharmazeutische Zusammensetzung, die eine oder mehrere der oben beschriebenen Nukleinsäuren oder das oben beschriebene Polypeptid umfaßt. Eine solche pharmazeutische Zusammensetzung kann zur Behandlung von Herz/Kreislaufstörungen, insbesondere solchen, die auf einer Fehlsteuerung des Sinusknotens beruhen, sowie Bewußtseinsstörungen, insbesondere solchen, die auf einer Fehlfunktion in cortico-thalamischen Neuronen beruhen, eingesetzt werden.



Im folgenden soll die Erfindung anhand der Beispiele und der beiliegenden Abbildungen beschrieben werden.

Dabei zeigen die Abbildungen das Folgende:

Abbildung 1A zeigt die Nukleinsäure- und die abgeleitete Proteinsequenz des Kanals aus Seeigel *Strongylocentrotus purpuratus*.

Abbildung 1B zeigt das S4-Motiv dieses Kanalproteins, im Vergleich mit anderen bekannten Kanalsequenzen;




Abbildung 1C zeigt das Porenmotiv dieser Sequenz im Vergleich mit anderen Sequenzen anderer Kanäle;

Abbildung 1D zeigt die cNMP-Bindungsdomäne der cDNA des I_h -Ionenkanals im Vergleich mit anderen Sequenzen von Ionenkanälen;

Abbildung 2A zeigt den nach innen gerichteten Strom mit einer komplexen Wellenform der durch die hyperpolarisierenden Spannungsschritte von einer Haltespannung von +10 mV zu negativeren Testwerten ausgelöst wird;

Abbildung 2B zeigt die Gleichgewichtsstrom/Spannungs(I/V)-Beziehung, bestimmt am Ende eines hyperpolarisierenden Spannungspulses;

Abbildung 2C zeigt das Meßprotokoll für die Bestimmung der „instantaneous“ I/V-Beziehung aus der Amplitude der Tail-Ströme;

Abbildung 2D zeigt die „instantaneous“ I/V-Beziehung, die leicht auswärts gleichrichtend ist, mit einer Umkehrspannung V_{rev} von -30 mV;

Abbildung 2E zeigt, daß der Zeitverlauf der „tail“-Ströme vom Zeitpunkt der Spannungsänderung abhängt;

Abbildung 2F zeigt die Spannungsabhängigkeit der relativen Wahrscheinlichkeit, daß der Kanal offen ist, P_o die aus der Amplitude von Tail-Strömen bei +10 mV bestimmt wurde, ähnlich wie die in Abbildung 2A dargestellten;

Abbildung 3A zeigt die Auslösung von großen Gesamtzell-Strömen durch Hyperpolarisierung in Anwesenheit von 1 mM cAMP, die sich mit Verzögerung entwickelten und langsam ein Gleichgewicht erreichten;

Abbildung 3B zeigt die Spannungsabhängigkeit von P_o , bestimmt aus normalisierten Ganzzell-„tail“-Strömen und „tail“-Strömen von inside-out-patches;

Abbildung 3C zeigt den schnellen Anstieg der Amplitude des nach innen gerichteten Stroms nach einer kurzen UV-Belichtung;

Abbildung 3D zeigt SPIH-Ströme von zellfreien Membranstücken ohne cAMP; und

Abbildung 3E das entsprechende wie Abbildung 3D jedoch mit cAMP;

Abbildung 3F zeigt die Abhängigkeit des Stroms von der cAMP-Konzentration, die durch eine einfache Bindungsisotherme mit $K_{1/2}$ von 0,74 μ M und einem Hillkoeffizienten, der sich nicht deutlich von eins unterscheidet, beschrieben werden kann;

Abbildung 4A und 4B zeigen die Blockade der SPIH-Kanäle durch Cs^+ (Abbildung 4A Kontrolle, Abbildung 4B + 10 mM Cs^+);

Abbildung 4C zeigt die I/V-Beziehung in Gegenwart von 0 bis 10 mM Cs^+ ;

Abbildung 4D zeigt einen Blot von normalisiertem Strom I/I_{max} (bei -70 mV) gegen Cs^+ ;

Abbildung 4E zeigt die Ionenselektivität von SPIH-Kanälen auf Inside-Out-Patches, wobei 100 mM des Bad- K^+ durch entsprechende Konzentrationen von Rb^+ , Na^+ , Li^+ oder Cs^+ ersetzt wurden;

Abbildung 4F zeigt die I/V-Beziehung unter den verschiedenen ionischen Bedingungen, die in Teil E gezeigt werden;

Abbildung 4G zeigt, daß die nach innen gerichteten Ströme fast vollständig unterbrochen waren, während sich die Amplituden der nach außen gerichteten Ströme nicht änderten, wenn das extrazelluläre Medium nur Na^+ enthielt;

Abbildung 4H zeigt die I/V-Beziehung der Ströme aus Teil G bei verschiedenen K^+ -Konzentrationen;

Abbildung 5A zeigt einen Northern Blot der Kanalboten-RNA mit einem Haupttranskript von ungefähr 3,3 kb und einem kleineren Transkript von 2,9 kb;

Abbildung 5B zeigt eine lichtmikroskopische Aufnahme von Spermien aus *S. purpuratus* (rechtes Bild) und die entsprechende immunhistochemische Anfärbung mit einem Antikörper, der den SPIH-Kanal spezifisch erkennt (linkes Bild).

Abbildung 5C zeigt eine entsprechende Western Blot Analyse.

Abbildung 6 zeigt eine schematische Darstellung des pc SPIH-Konstruktes, das für die heterologe Expression von SPIH in HEK 293-Zellen verwendet wurde. Der cDNA-Bereich ist als schraffierter Balken dargestellt, die angrenzenden Bereiche des Plasmidvektors (pcDNA I) als fette Linien. Aus der Lage des Promotors für die T7-Polymerase und der Schnittstellen im multiplen Klonierungsbereich kann die Orientierung der cDNA im Plasmidvektor abgeleitet werden. Die eingefügte Kozak-Sequenz ist mit K bezeichnet.

Ein repräsentativer Vertreter eines erfindungsgemäßen Ionenkanalproteins ist der Kanal aus Seeigel (SPIH). Die Kanalaktivität von HEK 293-Zellen, die mit dem pcSPIH-Konstrukt (Abb. 6) transfiziert worden waren, wurde mit Hilfe der Patch-Clamp-Methode in der Gesamtzellkonfiguration untersucht. Hyperpolarisierende Spannungsschritte zeigten einen einwärts gerichteten Strom mit einer komplexen Wellenform (vgl. Abb. 2A). Eine schnelle, nicht zeitaufgelöste Stromkomponente wurde gefolgt von einem zeitabhängigen Strom, der sich mit einer Verzögerung entwickelte und sich, nachdem das Maximum erreicht wurde, zu kleineren Amplituden abflachte, wenn die Testspannung $V_m \leq -30$ mV betrug (Abb. 2A). Nachdem V_m auf +10 mV zurückgestellt wurde, entwickelten sich „tail“-Ströme, die auch einen komplexen Zeitverlauf zeigten. Die Steady-State-Beziehung zwischen Strom/Spannung (I/V), am Ende des hyperpolarisierenden Spannungspulses (Pfeil in Abbildung 2A), zeigte eine stark einwärts gerichtete Rektifizierung (Fig. 2B). Die „instantaneous“ I/V-Beziehung wurde ermittelt aus der Amplitude der Tail-Ströme unter Verwendung eines anderen Protokolls für die Spannungsschritte (Abb. 2C). Die „instantaneous“ I/V-Beziehung war leicht auswärts rektifizierend mit einer Umkehrspannung, V_{rev} , von -30 mV (Abb. 2D). Die I/V-Beziehung wurde annähernd linear bei höheren $[K^+]_o$, da der einwärts gerichtete Natriumstrom signifikant verstärkt wurde durch $[K^+]_o$ (siehe Abbildung 4H). Es kann gefolgert werden, daß die Ströme stark einwärts rektifizierend sind, da der SPIH-Kanal bei positiven Spannungen entweder geschlossen oder inaktiviert ist. Die Spannungsabhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit, P_o (Abb. 2F), wurde ermittelt aus der Amplitude der Tail-Ströme bei +10 mV (Abb. 2A). Die Spannung, $V_{1/2}$, bei der ein halb-maximaler Strom beobachtet

wurde, lag bei $-26,1$ mV (7 Experimente). Somit ist der SPIH-Kanal inaktiv bei Spannungen $\geq +10$ mV und wird durch Hyperpolarisation geöffnet. Diese Spannungsabhängigkeit erinnert an hyperpolarisations-aktivierte Ströme (I_h), die in verschiedenen Zellen vorkommen (DiFrancesco, 1990, 1993; Pape, 1996). Wegen seiner ungewöhnlichen Eigenschaften ist der I_h auch als "queer"- oder "funny"-Strom (I_q und I_f) bezeichnet worden. Der erfindungsgemäße Kanal wird (1) aktiviert bei hyperpolarisierenden Spannungen; (2) direkt moduliert durch zyklische Nukleotide; (3) blockiert durch millimolare Konzentrationen an extrazellulärem Cs^+ ; (4) er ist kationselektiv mit einem $P_{\text{Na}}/P_{\text{K}}$ von $\sim 0,2$ bis $0,4$; und (5) die einwärts gerichteten Natriumströme sind sensitiv gegenüber $[\text{K}^+]_o$. Die folgenden Untersuchungen zeigen, daß die genannten Merkmale auch bei dem heterolog exprimierten SPIH-Kanal auftreten.

Wenn die Pipettenlösung 1 mM cAMP enthielt, führte die Hyperpolarisation zu starken Strömen, die sich mit einer Verzögerung entwickelten und langsam einen Steady-State-Zustand erreichten (Fig. 3A). Der sigmoidale Zeitverlauf des Stromes (siehe Abb. 3A, Kasten) ist charakteristisch für den zeitlichen Verlauf von I_h -Strömen aus Vertebraten. 1 mM cGMP in der Pipette änderte ebenfalls die SPIH-vermittelten Ströme. Die Spannungsabhängigkeit von P_o wurde mit Hilfe von Gesamtzell-Tail-Strömen ermittelt (Fig. 3B). Eine Anpassung an die Boltzmann-Gleichung ergab $V_{1/2} = -50,8$ mV. Die Dialyse der Zelle mit der Pipettenlösung beansprucht mehrere Minuten; somit könnten transiente Effekte von cAMP den Versuch beeinträchtigen. Es wurde deshalb eine Technik benutzt, die die rasche Fotofreisetzung von cAMP oder cGMP aus "caged" Derivaten einsetzt (vgl. Adams und Tsien, 1993; Hagen et al., 1996). Die Zellen wurden mit 100 μM caged cAMP dialysiert und die SPIH-Kanäle wurden durch Änderung der V_m von $+10$ mV auf -70 mV aktiviert; dann bewirkte ein kurzer Blitz von UV-Licht eine rasche Zunahme in der Amplitude des SPIH-vermittelten Einwärtsstroms (Abb. 3C). Die hyperpolarisationsaktivierten Ströme vor dem Blitz ähnelten Kontrollströmen (Abb. 3C, Spur 1), während die Amplitude und der Zeitverlauf der Ströme nach dem UV-Blitz (Abb. 3C, Spur 2) ähnlich waren zu denen, die in der Anwesenheit von cAMP aufgenommen wurden (Abb. 3E). Mit 100 μM „caged“ cGMP

in der Pipette änderten UV-Blitze von ähnlicher Dauer und ähnlicher Intensität nicht die SPIH-vermittelten Ströme. Ein Bindungsmotiv für zyklische Nukleotide legt nahe, daß cAMP direkt die Kanalaktivität verstärken könnte, ohne daß daran ein Phosphorylierungsmechanismus beteiligt ist. Zum Testen dieser Hypothese wurden die SPIH-Ströme an abgetrennten Membranflecken ohne (Abb. 3D) und mit cAMP (Abb. 3E) gemessen. cAMP (1 mM) steigerte die Amplituden der spannungsaktivierten Ströme bis auf das 20-fache. Der Stromanstieg durch cAMP war reversibel und erforderte kein Mg^{2+} /ATP. Die Umspülung der abgetrennten Membranflecken mit Lösungen, die verschiedene cAMP-Konzentrationen enthielten, steigerte die SPIH-Ströme in einer dosisabhängigen Weise. Die Abhängigkeit des Stroms von der cAMP-Konzentration kann durch eine einfache Bindungsisotherme mit $K_{1/2}$ von $0,74 \mu M$ und einem Hill-Koeffizienten, der sich nicht signifikant von eins unterscheidet, beschrieben werden (Abb. 3F). In den abgetrennten Membranflecken war $V_{1/2}$ in Anwesenheit von cAMP ungefähr 35 mV stärker negativ als $V_{1/2}$, das in der Gesamtzellkonfiguration gemessen wurde (Abb. 3B). Diese Beobachtung könnte darauf hindeuten, daß ein endogener Faktor, bereitgestellt durch die HEK293-Zelle, $V_{1/2}$ mitbestimmt. cGMP-Konzentrationen bis zu 1 mM änderten die Amplitude der SPIH-Ströme nicht. Aus diesem Experiment kann geschlossen werden, daß cAMP, aber nicht cGMP, die SPIH-Kanalaktivität modulieren kann. Somit ist im Gegensatz zu CNG-Kanälen (Finn et al., 1996) SPIH unter der doppelten Kontrolle von Spannung und cAMP. Das Blockieren der SPIH-Kanäle durch extrazelluläres Cs^{+} wurde an „Outside-Out“-Membranen mit dem Spannungsprotokoll von Abbildung 2C untersucht. Cs^{+} blockierte den SPIH-Kanal in einer konzentrations- und spannungsabhängigen Weise. In der Anwesenheit von 10 mM Cs^{+} verschwanden die Einwärtsströme vollständig, während die auswärts gerichteten Tail-Ströme noch vorhanden waren (vgl. Abb. 4A und 4B). Die I/V-Relation in Anwesenheit von 0 bis 10 mM Cs^{+} ist in Abbildung 4C gezeigt. Der normalisierte Strom I/I_{max} (bei -70 mV) wurde gegen $[Cs^{+}]$ aufgetragen (Abb. 4D). Die Daten wurden mit einer Hemmkonstante K_i von $245 \mu M$ und einem Hill-Koeffizienten von $n = 1,2$ angepaßt. Die Ionenselektivität des SPIH-Kanals wurde mit Inside-Out-Membranen bestimmt. Die Badlösungen enthielten immer 0,1 mM cAMP, um die Amplitude der Ströme zu erhöhen. Es wurden

100 mM K^+ im Bad durch Rb^+ , Na^+ , Li^+ oder Cs^+ (Abb. 4E) ersetzt. Aus den jeweiligen Verschiebungen von V_{rev} (Mittelwert von 3 bis 10 Experimenten) wurden die Permeabilitätsverhältnisse $P_K : P_{Rb} : P_{Na} : P_{Li} : P_{Cs}$ als 1 : 0,7 : 0,26 : 0,15 : 0,06 berechnet. Die Ionenselektivität von SPIH stimmt gut mit der Ionenselektivität verschiedener I_h -Kanäle aus Wirbeltieren überein (Pape, 1996; Wollmuth und Hille, 1992). Wenn das extrazelluläre Medium nur Na^+ enthielt, wurden die einwärts gerichteten Ströme nahezu vollständig eliminiert, während sich die Amplituden der auswärts gerichteten Ströme nicht wesentlich änderten (Abb. 4G). Die Erhöhung von $[K^+]_o$ auf 5 und 20 mM steigerte dramatisch die einwärts gerichteten Ströme. Diese Ergebnisse zeigen, daß der SPIH-Kanal wenig, wenn überhaupt, Natrium in Abwesenheit von Kaliumionen befördert.

Die Expression von Messenger-RNA des Kanalproteins wurde mittels Northern Blots analysiert. Ein Haupttranskript von rund 3,3 kb und ein Nebentranskript von 2,9 kb wurden in Poly(A)⁺-RNA aus männlichen, aber nicht weiblichen Gonaden nachgewiesen (Abb. 5A). Die Größe der Transkripte stimmt gut mit der Größe der klonierten cDNA (3 kb) überein. Die SPIH-spezifische Probe hybridisierte nicht mit Poly(A)⁺-RNA, die aus dem Darmtrakt des Seeigels isoliert worden war (Abb. 5A). Die ausschließliche Expression von SPIH-mRNA in den männlichen Gonaden legt nahe, daß der Kanal in Spermien exprimiert wird. Diese Hypothese wurde getestet mit gereinigten Antikörpern FPc44K und FPc45K, die gegen ein Fusionsprotein der C-terminalen Domäne des Kanalpolypeptids (Reste 662-767) gerichtet waren. Die Antikörper wurden für die Western-Blot-Analysen (Abb. 5C) und die Immunzytochemie (Abb. 5B) verwendet. Beide Antikörper erkannten eine Hauptbande von $M_r \sim 92K$ in Western Blots von Flagellenmembranen, die aus Seeigelspermien gereinigt wurden (Abb. 5C, Spur 3). Membranen, die aus dem Spermienkopf gereinigt worden waren, wurden nicht von den Antikörpern erkannt (Abb. 5C, Spur 5). Dieses Ergebnis wurde durch Immunzytochemie mit einzelnen Spermien bestätigt. Der Antikörper FPc45K färbte nahezu ausschließlich das Spermienflagellum (Abb. 5B); die schwache Färbung einiger Kopfstrukturen repräsentiert vermutlich unspezifische Kreuzreaktivität des Antikörpers. Eine Bande von $M_r \sim 88K$ wurde in Western-Blots von Membranen von transfizierten HEK293-Zellen beobachtet (Abb. 5C, Spur 2). Das M_r des Kanalpolypeptids, exprimiert in

HEK293-Zellen, ist nahezu identisch mit dem M_r -Wert, wie er von der abgeleiteten Aminosäuresequenz zu erwarten ist (87,9K). In Membranen von nicht-transfizierten HEK293-Zellen wurde kein 88K-Polypeptid durch den Antikörper nachgewiesen (Fig. 5C, Spur 1). Die Behandlung von Flagellenmembranen mit alkalischer Phosphatase erniedrigte den M_r des nativen Polypeptids von ~ 92K auf 88K. Da native und heterolog exprimierte Polypeptide von ähnlicher Größe sind, trägt die klonierte cDNA die vollständige kodierende Sequenz von SPIH. Die geringe Abnahme des M_r unter dephosphorylierenden Bedingungen zeigt an, daß das native Polypeptid in phosphorylierter Form mit einer leicht verringerten elektrophoretischen Mobilität vorliegt. In den meisten Dephosphorylierungsexperimenten war die Verschiebung von 92K auf 88K nicht vollständig, und es wurden zumindest zwei schwache Zwischenbanden beobachtet. Dieses Ergebnis legt nahe, daß das Kanalpolypeptid mehrfach phosphoryliert wird. Die SPIH-Sequenz trägt Sequenzmotive für die Phosphorylierung durch PKA, PKG, PKC und Tyrosinkinase (siehe Abb. 1A).

Die elektrophysiologischen Eigenschaften identifizieren SPIH unzweifelhaft als ein Mitglied der I_h -Kanalfamilie. Jedoch haben wir auch charakteristische Unterschiede zwischen SPIH und I_h -Kanälen aus Vertebraten beobachtet. Erstens: In Abwesenheit von cAMP ist der Strom von SPIH transient, während in Anwesenheit von cAMP der zeitliche Verlauf ähnlich ist wie bei I_h -Kanälen von Vertebraten. Zweitens: Die beträchtliche Zunahme des SPIH-Stroms durch cAMP resultiert primär aus einer Zunahme des Maximalstroms, während cAMP den kardialen I_h -Kanal so moduliert, daß $V_{1/2}$ zu positiveren Werten hin verschoben wird (DiFrancesco, 1993), ohne die Maximalamplituden zu beeinflussen (siehe jedoch Ingram und Williams, 1996; Accili et al. 1997). Schließlich wird der kardiale I_h auch durch mikromolare cGMP-Konzentrationen moduliert (DiFrancesco und Tortora, 1991), während SPIH diesen Effekt nicht zeigt. Der SPIH-Kanal zeigt große Ähnlichkeit sowohl mit den spannungsgesteuerten K^+ -Kanälen als auch den CNG-Kationenkanälen. Deshalb bilden die I_h -Kanäle eine eigene Klasse innerhalb der Superfamilie der spannungsgesteuerten Kanäle. SPIH besitzt ein charakteristisches Motiv eines Spannungssensors (S4), wie die K^+ -, Na^+ - und Ca^{2+} -Kanäle, die durch Depolarisation geöffnet werden. Obwohl es a priori keinen

Grund dafür gibt, das S4-Motiv als Spannungssensor in einem durch Hyperpolarisation aktivierten Kanal auszuschließen, ist doch der Mechanismus der Aktivierung wie in HERG-K⁺-Kanälen (Trudeau et al., 1995; Smith et al., 1996) wahrscheinlicher. Von der stark einwärts gerichteten Rektifizierung von HERG ist gezeigt worden, daß sie das Ergebnis der Inaktivierung ist, die die Kanäle bei positiven Spannungen schließt, aber die Kanäle erholen sich rasch von der Inaktivierung bei negativen Spannungen. In HERG-Kanälen ist die Inaktivierung viel schneller als die Aktivierung und deshalb kinetisch nicht sichtbar (Smith et al., 1996). Gemeinsam mit CNG-Kanälen besitzt SPIH eine zyklische-Nukleotide-bindende Region, und seine Eigenschaften werden durch cAMP moduliert. Wahrscheinlich verstärkt cAMP die SPIH-Aktivität durch Binden an die stark konservierte zyklische-Nukleotide-bindende Region. In CNG-Kanälen ist für die hohe Selektivität für cGMP gezeigt worden, daß diese mit einem Thr-Rest (T363 in der α -Untereinheit des Stäbchen-Photorezeptors; Altenhofen et al., 1991) und einem Asp-Rest (D604 in rCNG α ; Varnum et al., 1995) einhergeht. An den entsprechenden Positionen besitzt der SPIH-Kanal Val- und Ile-Reste; vermutlich kontrollieren diese Positionen auch die Ligandenselektivität in SPIH. Die physiologische Bedeutung der I_h-Kanäle in Flagellenmembranen von Spermien könnte wie folgt erklärt werden: Die Stimulation von *S. purpuratus*-Spermien mit dem chemotaktischen Peptid "Speract" ruft eine Hyperpolarisation hervor (Lee und Garbers, 1986; Garbers, 1989), von der angenommen wird, daß sie auf der Öffnung eines K⁺-Kanals beruht (Babcock et al., 1992). Bei höheren Peptidkonzentrationen folgt der Hyperpolarisation eine Depolarisation (Babcock et al., 1992). Zwei (oder mehr) Ionenkanal-Typen mit verschiedener Selektivität und Pharmakologie könnten zu der "Speract"-induzierten Depolarisation beitragen (siehe Darszon et al., 1996). Einer dieser Kanäle besitzt eine schwache K⁺-Selektivität ($P_{Na}/P_K \cong 0,2$) und eine extrem niedrige P_o (bei V_m = 0 mV), die stark erhöht wird durch cAMP, aber nicht durch cGMP (Labarca et al., 1996). Diese Beobachtungen legen nahe, daß dieser Kanal in der Tat SPIH ist. Die "Speract"-induzierte Hyperpolarisation könnte die SPIH-Kanalaktivität initiieren, die noch weiter gesteigert werden könnte durch eine gleichzeitige Erhöhung der cAMP-Spiegel (Hansbrough et al., 1980), mit Hilfe einer spannungsabhängigen Adenylatcyclase

(Beltrán et al., 1996). Bei der gegebenen ionischen Zusammensetzung von Meerwasser und einem P_{Na}/P_K von 0,2 bis 0,4 könnte das Öffnen des SPIH-Kanals und der anschließende Na^+ -Influx die "Speract"-induzierte Depolarisation bewirken. Es kann auch vernünftigerweise angenommen werden, daß die I_h -Kanäle, wie in Herzzellen oder thalamische Neuronen, an der Erzeugung von Oszillationen der Membranspannung beteiligt sind und dadurch die Oszillation von Ca^{2+} im Flagellum hervorrufen (Suarez et al., 1993). Die Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ könnte das Schlagmuster des Flagellums ändern und so zu der chemotaktischen Antwort beitragen.

BEISPIELE

Methoden

Isolierung der cDNA-Klone

Mit zwei degenerierten Primern (# 1764 und # 1772) wurde eine PCR auf Einzelstrang-cDNA (aus Seeigelgonaden, *Drosophila melanogaster*, Rinderretina, olfaktorischem Gewebe der Ratte) oder auf cDNA-Bibliotheken (aus humanem Thalamus bzw. Herz) durchgeführt. Ein 100 µl PCR-Ansatz hatte folgende Zusammensetzung: 3-10 ng Erststrang-cDNA bzw. ca. 10^5 pfu der cDNA-Bibliotheken, jeweils 1,6 µg der degenerierten Primer, 1 x PCR-Puffer, 2 mM dNTP, 1 U Prime-Zyme (Biometra). Der PCR-Ansatz wurde zunächst 2 min bei 94°C denaturiert und dann 45 Zyklen folgendermaßen inkubiert:

Denaturierung: 94°C, 45 sec
 Hybridisierung: 48°C, 45 sec
 Polymerisierung: 72°C, 40 sec

Die Sequenzen der degenerierten Primer sind (in 5'→3'-Richtung):

1764: CTGACTGCAGARGTNTTYCARCCNGGNGA (Seq. ID Nr. 12)
 # 1772: ATCGGAATTCNCCRAARTANGANCCRTC (Seq. ID Nr. 13)

Die mit den Primern # 1764 und 1772 amplifizierten PCR-Fragmente wurden radioaktiv markiert und als Sonden benutzt, um cDNA-Bibliotheken unter hoher Stringenz nach den vollständigen cDNAs zu durchsuchen. Der Teilklon HHHH (Seq: ID Nr. 11) wurde durch niedrig-stringente Hybridisierung isoliert. Die Hybridisierungsbedingungen waren:

	hohe Stringenz	niedrige Stringenz
Prähybridisierung	5 x SSC ⁽¹⁾ , 5 x Denhardt's ⁽²⁾ , 0,1 % SDS, 0,1 mg/ml Herings- sperma-DNA, 1-2 h, 65°C	5 x SSC ⁽¹⁾ , 5 x Denhardt's ⁽²⁾ , 0,1 % SDS, 0,1 mg/ml Herings- sperma-DNA, 1-2 h, 55°C
Hybridisierung	Prähybridisierungslösung mit 50-100 ng 32P-markierter DNA (1x10 ⁶ cpm/ml), 12-14 h, 65°C	Prähybridisierungslösung mit 50-100 ng 32P-markierter DNA (1x10 ⁶ cpm/ml), 12-14 h, 65°C
Waschen	1 x SSC(1), 0,1 % SDS 2 x 30 min, 65°C	2 x SSC(1), 0,1 % SDS 2 x 30 min, 55°C

⁽¹⁾ 1 x SSC 150 mM NaCl, 15 mM Na-Citrat, pH 7,0

⁽²⁾ 1 x Denhardt's Ficoll, Polyvinylpyrrolidon, Rinderserum-Albumin (je 0,2 g/l)

Die positiven Phagen wurden vereinzelt und die cDNA durch "in vivo excision" (bei λ ZAPII-Phagen) in pBluescriptSK-Derivate überführt. Aus λ gt11-Phagen wurde die cDNA mit EcoRI ausgeschnitten und in pBluescriptSK-Plasmid-DNA subkloniert. Die DNA wurde mit der Didesoxy-Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977) sequenziert.

Northern und Western Blot

Poly(A)⁺RNA, isoliert aus verschiedenen Geweben des Seeigels, wurde durch Northern Blot analysiert. Jede Spur enthielt ungefähr 10 μ g Poly(A)⁺RNA. Der Blot wurde mit einem ³²P-markierten 1074 bp cDNA-Fragment (Nukleotidpositionen) bei 42°C, 5 x SSC und 50 % Formamid hybridisiert. Ein C-terminaler Be-

reich des SPIH-Polypeptids wurde als Fusionskonstrukt mit dem Maltosebindungsprotein exprimiert. Das gereinigte Fusionsprotein wurde verwendet, um die polyklonalen Antikörper FPc44K und FPc45K zu erzeugen; die Antikörper wurden aus Kaninchenserum durch Affinitätschromatographie unter Verwendung des Fusionsproteins gereinigt. Spermienflagellen wurden vom Kopf gemäß Darszon et al. (1994) abgetrennt. Gereinigte Flagellen und Kopfmembranen wurden in einem Lösungspuffer homogenisiert, der 150 mM NaCl, 1 mM $MgCl_2$, 20 mM Hepes bei pH 7,5, 0,1 mM EGTA und 0,5 % Triton X100 enthielt, gefolgt von einer Zentrifugation für 60 Minuten bei 40000 Upm. Dieses Verfahren wurde 2 x wiederholt. Transfizierte HEK293-Zellen wurden in einem Lysepuffer homogenisiert (10 mM Hepes, 1 mM DTT und 1 mM EDTA bei pH 7,4), 5 x gefriergetrocknet (in flüssigem N_2) und schließlich 10 min bei 55000 Upm zentrifugiert. Das Membranpellet wurde in dem Lösungspuffer gelöst. Flagellenmembranproteine wurden mit einer Einheit alkalischer Phosphatase in Lösungspuffer 30 bis 60 min bei 30°C dephosphoryliert. Die Membranproteine wurden durch SDS-PAGE getrennt, auf Immobilon-Membranen übertragen und mit den polyklonalen Antikörpern markiert. Die Immunoreaktivität wurde durch das ECL-Detektionskit (Amersham) sichtbar gemacht. Die Immunocytochemie an einem einzelnen Spermium wurde wie vorher beschrieben durchgeführt (Weiner 1997).

Elektrophysiologie

cDNA, die das SPIH-Polypeptid kodierte, wurde transient in HEK293-Zellen exprimiert, wie früher beschrieben (Baumann et al., 1994). SPIH-gesteuerte Ströme wurden mit der Patch-clamp-Methode in der Gesamtzellkonfiguration sowie zellfreien Membranflecken aufgenommen. Die Zusammensetzung verschiedener Bad- und Pipettenlösungen sind in den Abbildungslegenden (s.u.) angegeben. Die Kanäle wurden durch Abstufung der Membranspannung von +10 mV auf verschiedene negative Spannungswerte aktiviert. Leckströme wurden unter Verwendung eines P/8-Protokolls abgezogen. Die Spannungsabhängigkeit der Wahrscheinlichkeit, daß der Kanal offen ist, wurde aus Tail-Strömen bei + 10 mV bestimmt. Die Blockade des SPIH-Kanals durch Cs^+ wurde mit Outside-Out-

Membranflecken in Gegenwart von 1 mM cAMP in einer Pipettenlösung untersucht. Die Lösungen in dem Bad enthielten 0,03 bis 10 mM CsCl. Relative Ionenpermeabilitäten wurden aus der respektiven Verlagerung von V_{rev} berechnet, das an zellfreien Inside-Out-Membranflecken gemessen wurde, wenn 100 mM K^+ im Bad durch Na^+ , Li^+ , Rb^+ oder Cs^+ ersetzt worden waren. Experimente mit caged cAMP oder caged cGMP wurden wie vorher beschrieben durchgeführt (Hagen et al. 1996).

Im folgenden werden die Ergebnisse dieser Experimente genauer beschrieben.

In **Abbildung 1A** zeigt die Nukleinsäure-Sequenz und die abgeleitete Aminosäuresequenz des I_h -Kanals aus Seeigel. Nukleotide sind in 5'→3'-Richtung nummeriert, wobei +1 dem ersten Nukleotid des Startkodons (ATG) des offenen Leserahmens entspricht. Nukleotide 5'-wärts von Nukleotid +1 sind mit negativen Zahlen bezeichnet. Die abgeleitete Aminosäuresequenz (Ein-Buchstaben-Kode) ist unter der Nukleinsäuresequenz angegeben und ebenfalls nummeriert. Das Startkodon (ATG), das entsprechende Methionin und das Stopkodon (TGA; Pos. 2302-2304) sind fett gedruckt. Stopkodons im gleichen Leserahmen vor dem Startkodon sind unterstrichen. Das Polyadenylierungssignal an Position 2501-2507 ist umrahmt. Die Lage der transmembranalen Segmente S1-S6, der Porenbildenden Region und der Bindestelle für zyklische Nukleotide (cNMP-Bindestelle) ist durch Balken über der Nukleinsäuresequenz gekennzeichnet. Die Grenzen dieser Bereiche wurden durch Sequenzvergleich mit anderen spannungsabhängigen K^+ -Kanälen, EAG- K^+ -Kanälen und CNG-Kanälen festgelegt. Konsensussequenzen für Phosphorylierung durch cAMP/cGMP-abhängige Kinasen sind durch Dreiecke (Δ) markiert. Konsensussequenzen für Phosphorylierung durch Proteinkinase C sind durch Kreise (\bullet) und durch Tyrosinkinase durch einen Stern (\star) markiert. Die SPIH-Sequenz kodiert für ein Protein von 767 Aminosäuren mit einem errechneten Molekulargewicht von 87.937 Da.

Abbildung 1B zeigt einen Vergleich der Spannungssensor(S4)-Motive von SPIH und anderen Kanälen. Arg- oder Lys-Reste in regelmäßigen Abständen sind

durch Einrahmung hervorgehoben. Andere positiv geladene Reste sind in Fettdruck.

Shaker (Pongs et al., 1988), K⁺-Kanal, kodiert durch das *Drosophila* Shakergen; DmEAG (Warmke et al., 1991), *Drosophila* EAG-Kanal; HERG, menschliches EAG-verwandtes Gen (Warmke und Ganetzky, 1994); KAT1 (Anderson et al., 1992), K⁺-Kanal von *Arabidopsis thaliana*; brCNGC α (Kaupp et al., 1989), α -Untereinheit des cyclischen nukleotidgesteuerten Kanals von bovinen Stäbchenphotorezeptoren.

In der **Abbildung 1C** wird das Porenmotiv von SPIH mit den Porenmotiven anderer Mitglieder der Superfamilie der spannungs- und cyclischen nukleotidgesteuerten Ionenkanäle dargestellt:

Die Reste, die mit den korrespondierenden Aminosäuren in SPIH identisch oder ähnlich sind, werden durch einen schwarzen oder grauen Hintergrund hervorgehoben.

Die **Abbildung 1D** zeigt einen Sequenzvergleich von cNMP-Bindungsdomänen. boCNGC α , die α -Untereinheit des CNG-Kanals von bovinen olfaktorischen Neuronen (Ludwig et al., 1990); PKA1, die cAMP-Bindungsstelle 1 der Proteinkinase A (Titani et al., 1984); die cGMP-Bindungsstelle 1 der Proteinkinase G (Takio et al., 1984); CAP, das katabolite Aktivatorprotein (Aiba et al., 1982). Reste, die in zyklischen Nukleotidbindungsmotiven hochkonserviert sind, sind durch Pfeile angezeigt; Reste, die die Ligandenselektivität in brCNGC α bestimmen, sind durch einen Stern angegeben. Vorhersagen über die Ausbildung von Sekundärstrukturen, die aus der cAMP-Bindungsdomäne von CAP abgeleitet wurden, werden als Balken unterhalb der Sequenz angegeben.

Abbildung 2 zeigt die elektrophysiologische Charakterisierung des SPIH-Kanals.

In **Abbildung 2A** ist der Strom dargestellt, der von transfizierten HEK293-Zellen in der Gesamtzellkonfiguration aufgezeichnet wurde. Der Strom wurde durch Abstufung der Spannung von einem Haltewert bei +10 mV auf verschiedene Testwerte von -100 mV bis +10 mV in Abständen von 10 mV aktiviert. Tail-Ströme wurden durch Abstufung der Spannung vom Testwert zurück zu +10 mV aufgezeichnet. Die HEK293-Zellen wurden mit einer Badlösung umspült, die folgendes enthielt (mM): 135 NaCl, 5 KCl, 1,8 CaCl₂, 2,8 MgCl₂ und 5 Hepes-NaOH bei pH 7,4; die Pipettenlösung enthielt die folgenden Substanzen (mM): 126 KCl, 10 Hepes-KOH, 10 EGTA bei pH 7,4.

In **Abbildung 2B** ist Spannung-Strom(I/V)-Beziehung aufgetragen, gemessen unter Gleichgewichtsbedingungen zur Zeit des in Abbildung 2A durch den Pfeilkopf angezeigten Zeitpunkts.

Abbildung 2C zeigt das Meß-Protokoll, mit dem die „instantaneous“ I/V-Beziehung bestimmt wurde; die Spannung wurde zunächst von einem Haltewert von 0 mV auf -70 mV abgestuft, gefolgt von Stufen auf Testwerte im Bereich von +50 mV bis -70 mV in 10 mV-Abständen.

Abbildung 2D zeigt dann den Plot der „instantaneous“ I/V-Beziehung, gemessen zur Zeit wie in Abbildung 2C (eingerahmtes Bild) durch den Pfeil angezeigt.

Abbildung 2E zeigt, daß der Zeitverlauf der „tail“-Ströme von dem Zeitpunkt abhängt, zu dem die Spannung auf +30 mV zurückgesetzt wird.

Abbildung 2F zeigt die Spannungsabhängigkeit der relativen Offenwahrscheinlichkeit, P_o , des Kanals. Die Tail-Stromamplituden (Pfeil in Teil a) wurden auf den maximalen Strom normalisiert. Die Mittelpunktspannung, $V_{1/2}$ betrug -26,1 mV. Die effektive Ladungsmenge, Q , die während des Kanalschaltens fließt, beträgt 3.5 Elementarladungen. Sie wurde aus einer Anpassung der Boltzmann-Funktion an die Daten erzielt. Mittel von 7 Experimenten.

In **Abbildung 3** ist die Modulation von SPIH-Kanälen durch zyklische Nukleotide angegeben.

Abbildung 3A zeigt den Gesamtzell-SPIH-Strom in Gegenwart von 1 mM cAMP. Das Spannungsstufenprotokoll ist dasselbe wie in **Abbildung 2A**. Das Bad enthielt (mM): 135 NaCl, 5 KCl, 1,8 CaCl₂, 2,8 MgCl₂ und 5 Hepes-NaOH bei pH 7,4; die Pipettenlösung enthielt (mM): 126 KCl, 10 Hepes-KOH, 10 EGTA bei pH 7,4 und 1 mM cAMP. Das eingerahmte Bild zeigt eine Vergrößerung, an der der sigmoidale Zeitverlauf besonders gut zu erkennen ist.

Abbildung 3B zeigt, die Spannungsabhängigkeit der relativen P_o , abgeleitet von normalisierten Gesamtzell-Tail-Strömen bei +10 mV (●) und von Tail-Strömen, die von Inside-Out-Patches aufgezeichnet wurden (Δ). Eine durchgezogene Linie stellt einen Fit der Boltzmann-Gleichung an die Daten dar. $V_{1/2}$ für die Gesamtzellströme von Teil A betrug -50,8 mV und für die Inside-out-patch-Ströme von Teil E betrug sie -84,7 mV; die Q-Werte betrugen 3,8 bzw. 2,7.

Abbildung 3C zeigt die Modulierung von Gesamtzell-SPIH-Strömen durch die Photolyse von „caged“ cAMP. Die Pipettenlösung enthielt 100 μM caged cAMP. Der SPIH-Strom wurde durch Spannungssprünge von +10 mV auf -70 mV aktiviert bevor der UV-Blitz gegeben wurde (Spur 1) und nach drei aufeinanderfolgenden UV-Blitzen (Spur 2). Der Zeitverlauf des Blitz-vermittelten Anstiegs des Stromes bei -70 mV ist darunter gezeigt.

Die **Abbildungen 3D und E** zeigen spannungsaktivierte SPIH-Ströme in Inside-Out-Membran-Patches ohne cAMP (D) und in Gegenwart von 1 mM cAMP (E) im Bad. Das Spannungsstufenprotokoll wurde wie in **Abbildung 2A** durchgeführt. Die Pipetten und Badlösungen enthielten (mM): 126 KCl, 10 Hepes-KOH, 10 EGTA bei pH 7,4 und 1 mM cAMP (Bad).

Aus **Abbildung 3F** ist die Abhängigkeit der SPIH-Stromamplitude von der cAMP-Konzentration ablesbar; die cAMP-Konzentrationen waren wie folgt (μM): 0,1;

0,3; 1; 3; 10 und 1000. Eine durchgezogene Linie zeigt eine Anpassung der Hill-Gleichung an die Daten; $K_{1/2} = 0,74 \mu\text{M}$; $n = 1,05$; Mittel von 10 Experimenten.

Die **Abbildung 4** zeigt mehrere pharmakologische Eigenschaften des SPIH-Kanals.

Die **Abbildungen 4A und B** zeigen spannungsaktivierte SPIH-Ströme, aufgezeichnet durch Outside-Out-Membran-Patches ohne (A) und mit 10 mM Cs^+ (B) im Bad; die Pipettenlösung enthielt das folgende (mM): 124 KCl, 10 Hepes-KOH, 10 EGTA bei pH 7,4 und 1 mM cAMP; die Badlösung enthielt (mM): 126 KCl, 10 Hepes-KOH, 10 EGTA bei pH 7,4 und die angegebenen Konzentrationen von CsCl.

Abbildung 4C zeigt wiederum die *I/V*-Beziehung in Gegenwart von 0 bis 10 mM Cs^+ im Bad.

Aus **Abbildung 4D** ist die Abhängigkeit des normalisierten Stroms bei -70 mV auf $[\text{Cs}^+]$ ablesbar. Die durchgezogene Linie stellt eine Angleichung der Hill-Gleichung an diese Daten dar; $K_i = 245 \mu\text{M}$, Hill-Koeffizient 1,2 (Mittel von 1-6 Experimenten).

Abbildung 4E zeigt die Ionenselektivität des SPIH-Kanals. V_{rev} wurde auf Inside-Out-Patches durch Abstufung der Haltespannung (-70 mV) auf Testwerte zwischen -30 mV und +30 mV in 5 mV-Schritten bestimmt. Die Pipettenlösung enthielt das folgende (mM): 150 KCl, 10 Hepes-NMDG, 10 EGTA bei pH 7,4; die Badlösung war wie folgt zusammengesetzt (mM): 50 KCl, 100 XCl, 10 Hepes-NMDG, 10 EGTA bei pH 7,4 und 0,1 cAMP.

Abbildung 4F zeigt die *I/V*-Beziehung der Ströme, die im Teil E gezeigt werden. V_{rev} betrug 16,9 mV (Na^+), 20,6 mV (Li^+), 5,6 mV (Rb^+) und 24,6 mV (Cs^+); Mittel von 3 bis 10 Experimenten. Die relativen Ionenpermeabilitäten P_X/P_K wurden ge-

mäß der Gleichung $P_x/P_K = \{[K^+]_o - [K^+]_i \exp(zFV_{rev}/RT)\} / [X^+]_i \exp(zFV_{rev}/RT)$ berechnet.

Abbildung 4G zeigt die K^+ -Abhängigkeit von Gesamtzell-, nach innen gerichteten Na^+ -Strömen in Gegenwart von 0,5 mM und 20 mM K^+ im extrazellulären Medium.

Abbildung 4H zeigt die „instantaneous“ I/V-Beziehungen in Anwesenheit von 0, 1, 3, 5, 10, und 20 mM K^+ im Bad.

Die Pipettenlösung war wie in Teil B, die Badlösung wie in Abbildung 1A mit den angezeigten K^+ -Konzentrationen; die Ionenstärken wurden auf den selben Wert durch die jeweiligen NMDG-Konzentrationen eingestellt.

Abbildung 5 zeigt das Expressionsmuster von SPIH.

Abbildung 5A ist eine Northern-Blot-Analyse der Gewebeverteilung von SPIH-Transkripten in mRNA von männlichen Gonaden (Spur 1), weiblichen Gonaden (Spur 2) und Intestinalzellen (Spur 3); jeweils 10 µl Poly(A)⁺RNA.

Abbildung 5B ist eine Western Blot Analyse von Membranen von scheintransfizierten HEK293-Zellen (Spur 1; 2,5 µg Protein), HEK293-Zellen, die mit SPIH-cDNA transfiziert waren (Spur 2; 2,5 µg Protein), gereinigten Flagellen von Spermien von *S. purpuratus* (Spur 3; 6 µg Protein), dephosphorylierten Flagellenmembranen (Spur 4; 6 µg Protein) und von Spermienköpfen (Spur 5; 15 µg Protein).

Referenztable der im Text durch Seq. ID Nummern beschriebenen DNA-Sequenzen

Seq. ID Nr.	DNA Sequenz
1	Teilsequenz des I_h -Kanals aus menschlichem Thalamusgewebe
2	Teilsequenz eines I_h -Kanals aus olfaktorischem Gewebe der Ratte
3	Teilsequenz eines I_h -Kanals aus Retinagewebe vom Rind
4	vollständige Sequenz des I_h -Kanals aus Spermien des Seeigels
5	vollständige Sequenz des I_h -Kanals aus <i>Drosophila melanogaster</i>
6	Teilsequenz eines I_h -Kanals aus Retinagewebe vom Rind
7	Teilsequenz eines I_h Kanals aus Retinagewebe vom Rind
8	Teilsequenz eines I_h -Kanals aus olfaktorischem Gewebe der Ratte
9	Teilsequenz eines I_h -Kanals aus olfaktorischem Gewebe der Ratte
10	Teilsequenz eines I_h Kanals aus menschlichem Thalamusgewebe
11	Teilsequenz eines I_h -Kanals aus menschlichem Herzgewebe

Literaturliste

Accili, E.A., Redaelli, G. and DiFrancesco, D.: Differential control of the hyperpolarization-activated current (i) by cAMP gating and phosphatase inhibition in rabbit sino-atrial node myocytes. *J.Physiol.* 500 (1997) 643-651.

Adams, S.R. and Tsien, R.Y.: Controlling cell chemistry with caged compounds. *Annu.Rev.Physiol.* 55 (1993) 755-784.

Aiba, H., Fujimoto, S. and Ozaki, N.: Molecular cloning and nucleotide sequencing of the gene for *E. coli* cAMP receptor protein. *Nucleic Acids Res.* 10 (1982) 1345-1361.

Altenhofen, W., Ludwig, J., Eismann, E., Kraus, W., Bönigk, W. and Kaupp, U.B.: Control of ligand specificity in cyclic nucleotide-gated channels from rod photoreceptors and olfactory epithelium. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 88 (1991) 9868-9872.

Anderson, J.A., Huprikar, S.S., Kochian, L.V., Lucas, W.J. and Gaber, R.F.: Functional expression of a probable *Arabidopsis thaliana* potassium channel in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 89 (1992) 3736-3740.

Araki, T., Ito, M. and Oshima, T.: Potential changes produced by application of current steps in motoneurons. *Nature* 191 (1962) 1104-1105.

Attwell, D. and Wilson, M.: Behavior of the rod network in the tiger salamander retina mediated by membrane properties of individual rods. *J.Physiol.* 309 (1980) 287-315.

Babcock, D.F., Bosma, M.M., Battaglia, D.E. and Darszon, A.: Early persistent activation of sperm K channels by the egg peptide speract. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 89 (1992) 6001-6005.

Bader, C.R., MacLeish, P.R. and Schwartz, E.A.: A voltage-clamp study of the light response in solitary rods of the tiger salamander. *J.Physiol.* 296 (1979) 1-26.

Bader, C.R., Bertrand, D. and Schwartz, E.A.: Voltage-activated and calcium-activated currents studied in solitary rod inner segments from the salamander retina. *J.Physiol.* 331 (1982) 253-284.

Baumann, A., Frings, S., Godde, M., Seifert, R. and Kaupp, U.B.: Primary structure and functional expression of a *Drosophila* cyclic nucleotide-gated channel present in eyes and antennae. *EMBO J.* 13 (1994) 5040-5050.

Beltrán, C., Zapata, O. and Darszon, A.: Membrane potential regulates sea urchin sperm adenylylcyclase. *Biochemistry* 35 (1996) 7591-7598.

Brown, H.F. and DiFrancesco, D.: Voltage clamp investigations of current underlying pacemaker activity in rabbit-sino-atrial node. *J. Physiol.* 308 (1980) 221-251.

Brown, H.F., DiFrancesco, D. and Noble, S.J.: How does adrenaline accelerate the heart? *Nature* 280 (1979) 235-236.

Darszon, A., Labarca, P., Beltrán, C., García-Soto, J. and Liévano, A.: Sea urchin sperm: An ion channel reconstitution study case. *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 6 (1994) 37-50.

Darszon, A., Liévano, A. and Beltrán, C.: Ion channels: Key elements in gamete signaling. In *Current Topics in Developmental Biology*, Vol. 44. Academic Press, San Diego, 1996, pp.117-167.

DiFrancesco, D.: A new interpretation of the pace-maker current in calf Purkinje fibres. *J. Physiol.* 314 (1981a) 359-376.

DiFrancesco, D.: A study of the ionic nature of the pace-maker current in calf Purkinje fibres. *J. Physiol.* 314 (1981b) 277-293.

DiFrancesco, D.: The hyperpolarization-activated current, i_h , and cardiac pace-making. In Rosen, M.R., Janse, M.J. and Wit, A.L. (Eds.), *Cardiac Electrophysiology: a Textbook*. Futura, New York, 1990, pp.117-132.

DiFrancesco, D.: Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. *Annu.Rev.Physiol.* 55 (1993) 455-472.

DiFrancesco, D. and Tortora, P.: Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature* 351 (1991) 145-147.

Fain, G.L., Quandt, F.N., Bastian, B.L. and Gerschenfeld, H.M.: Contribution of a caesium-sensitive conductance increase to the rod photoresponse. *Nature* 272 (1978) 467-469.

Finn, J.T., Grunwald, M.E. and Yau, K.-W.: Cyclic nucleotide-gated ion channels: An extended family with diverse functions. *Annu.Rev.Physiol.* 58 (1996) 395-426.

Garbers, D.L.: Molecular basis of fertilization. *Annu.Rev.Biochem.* 58 (1989) 719-742.

Garbers, D.L.: Guanylyl cyclase receptors and their endocrine, paracrine, and autocrine ligands. *Cell* 71 (1992) 1-4.

Hagen, V., Dzeja, C., Frings, S., Bendig, J., Krause, E. and Kaupp, U.B.: Caged compounds of hydrolysis-resistant analogues of cAMP and cGMP: Synthesis and application to cyclic nucleotide-gated channels. *Biochemistry* 35 (1996) 7762-7771.

Halliwel, J.V. and Adams, P.R.: Voltage-clamp analysis of muscarinic excitation in hippocampal neurons. *Brain Res.* 250 (1982) 71-92.

Hansbrough, J.R., Kopf, G.S. and Garbers, D.L.: The stimulation of sperm metabolism by a factor associated with eggs and by 8-bromo-guanosine 3',5'-monophosphate. *Biochim.Biophys.Acta* 630 (1980) 82-91.

Hille, B.: Ionic channels of excitable membranes. Sinauer Associates Inc., Sunderland, 1992.

Hodgkin, A.L. and Huxley, A.F.: A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J.Physiol.* 117 (1952) 500-544.

Ingram, S.L. and Williams, J.T.: Modulation of the hyperpolarization-activated current (I) by cyclic nucleotides in guinea-pig primary afferent neurons. *J.Physiol.* 492 (1996) 97-106.

Ito, M. and Oshima, T.: Electrical behavior of the motoneurone membrane during intracellularly applied current steps. *J. Physiol.* 180 (1965) 607-635.

Kaupp, U.B., Niidome, T., Tanabe, T., Terada, S., Bönigk, W., Stühmer, W., Cook, N.J., Kangawa, K., Matsuo, H., Hirose, T., Miyata, T. and Numa, S.: Primary structure and functional expression from complementary DNA of the rod photoreceptor cyclic GMP-gated channel. *Nature* 342 (1989) 762-766.

Labarca, P., Santi, C., Zapata, O., Morales, E., Beltrán, C., Liévano, A. and Darszon, A.: A cAMP regulated K-selective channel from the sea urchin sperm plasma membrane. *Develop.Biol.* 174 (1996) 271-280.

Lee, H.C. and Garbers, D.L.: Modulation of the voltage-sensitive Na/H exchange in sea urchin spermatozoa through membrane potential changes induced by the egg peptide speract. *J.Biol.Chem.* 261 (1986) 16026-16032.

Llinás, R.R.: The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons; insights into central nervous system function. *Science* 242 (1988) 1654-1664.

Ludwig, J., Margalit, T., Eismann, E., Lancet, D. and Kaupp, U.B.: Primary structure of cAMP-gated channel from bovine olfactory epithelium. *FEBS Lett.* 270 (1990) 24-29.

Pape, H.-C.: Queer current and pacemaker: The hyperpolarization-activated cation current in neurons. *Annu.Rev.Physiol.* 58 (1996) 299-327.

Pongs, O., Kecskemethy, N., Müller, R., Krah-Jentgens, I., Baumann, A., Kiltz, H.H., Canal, I., Llamazares, S. and Ferrus, A.: *Shaker* encodes a family of putative potassium channel proteins in the nervous system of *Drosophila*. *EMBO J.* 7 (1988) 1087-1096.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 74 (1977) 5463-5467.

Smith, P.L., Baukrowitz, T. and Yellen, G.: The inward rectification mechanism of the HERG cardiac potassium channel. *Nature* 379 (1996) 833-836.

Suarez, S.S., Varosi, S.M. and Dai, X.: Intracellular calcium increases with hyperactivation in intact, moving hamster sperm and oscillates with the flagellar beat cycle. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 90 (1993) 4660-4664.

Takio, K., Wade, R.D., Smith, S.B., Krebs, E.G., Walsh, K.A. and Titani, K.: Guanosine cyclic 3',5'-phosphate dependent protein kinase, a chimeric protein homologous with two separate protein families. *Biochemistry* 23 (1984) 4207-4218.

Titani, K., Sasagawa, T., Ericsson, L.H., Kumar, S., Smith, S.B., Krebs, E.G. and Walsh, K.A.: Amino acid sequence of the regulatory subunit of bovine type I adenosine cyclic 3',5'-phosphate dependent protein kinase. *Biochemistry* 23 (1984) 4193-4199.

Trudeau, M.C., Warmke, J.W., Ganetzky, B. and Robertson, G.A.: HERG, a human inward rectifier in the voltage-gated potassium channel family. *Science* 269 (1995) 92-95.

Varnum, M.D., Black, K.D. and Zagotta, W.N.: Molecular mechanism for ligand discrimination of cyclic nucleotide-gated channels. *Neuron* 15 (1995) 619-625.

Warmke, J., Drysdale, R. and Ganetzky, B.: A distinct potassium channel polypeptide encoded by the *Drosophila* *eag* locus. *Science* 252 (1991) 1560-1562.

Warmke, J.W. and Ganetzky, B.: A family of potassium channel genes related to *eag* in *Drosophila* and mammals. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 91 (1994) 3438-3442.

Weiner, J.: Molekularbiologische, immunologische und funktionelle Charakterisierung von β -Untereinheiten des zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanals aus dem Rinderhoden. Dissertation (1996) Universität Düsseldorf

Wollmuth, L.P. and Hille, B.: Ionic selectivity of I_h channels of rod photoreceptors in tiger salamanders. *J.Gen.Physiol.* 100 (1992) 749-765.

Yanagihara, K. and Irisawa, H.: Inward current activated during hyperpolarization in the rabbit sino atrial node cell. *Pflügers Arch.* 385 (1980) 11-19.

Dayhoff, M.O., Schwartz, R. M., Orcutt, B.C. (1978) in: Atlas of protein sequence and structure, Band 5, Suppl. 3, Hrsg.: Dayhoff, M.O., National Biomedical Research Foundation, Silver Spring, MD, S. 345-352.

Patentansprüche

1. Nukleinsäure, vorzugsweise DNA, die für einen I_h-Ionenkanal oder einen Teil davon kodiert oder dazu komplementäre Nukleinsäure.
2. Nukleinsäure nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Nukleinsäure humanen Ursprungs ist.
3. Nukleinsäure nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie die Sequenz gemäß Seq. ID Nr. 1 oder Teile davon umfaßt.
4. Nukleinsäure nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Nukleinsäure aus Ratte stammt.
5. Nukleinsäure nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie die Sequenz gemäß Seq. ID Nr. 2 oder Teile davon umfaßt.
6. Nukleinsäure nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Nukleinsäure aus Rind stammt.
7. Nukleinsäure nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie die Sequenz gemäß Seq. ID Nr. 3 oder Teile davon umfaßt.
8. Nukleinsäure nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Nukleinsäure aus Seeigel stammt.
9. Nukleinsäure nach Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie die Sequenz gemäß Seq. ID Nr. 4 oder Teile davon umfaßt.
10. Nukleinsäure nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Nukleinsäure aus *Drosophila* stammt.

11. Nukleinsäure nach Anspruch 10, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie die Sequenz gemäß Seq. ID Nr. 5 oder Teile davon umfaßt.

12. Nukleinsäure, vorzugsweise DNA, **dadurch gekennzeichnet**, daß deren Sequenz mindestens 80 % Homologie zu einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 11 aufweist.

13. Nukleinsäure nach Anspruch 12, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Homologie mindestens 90 % beträgt.

14. Nukleinsäure, vorzugsweise DNA, **dadurch gekennzeichnet**, daß es unter geringer Stringenz mit Seq. ID Nr. 1, 2, 3, 4 und/oder 5 hybridisiert.

15. Nukleinsäure nach Anspruch 14, **dadurch gekennzeichnet**, daß es unter stringenten Bedingungen mit Seq. ID Nr. 1, 2, 3, 4 und /oder 5 hybridisiert.

16. Nukleinsäure nach Anspruch einem der Ansprüche 1 bis 15, **dadurch gekennzeichnet**, daß es eine RNA ist.

17. Polypeptid, kodiert von einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 16.

18. Verwendung einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 16 und/oder eines Polypeptids nach Anspruch 17 zum Identifizieren von Substanzen, die die Aktivität des Ionenkanals beeinflussen.

19. Verwendung einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 16 und/oder eines Polypeptids nach Anspruch 17 in der Therapie und/oder Diagnose von Ionenkanal-assoziierten Erkrankungen.

20. Verfahren zum Identifizieren von Substanzen mit Wirkung auf Ionenkanäle, umfassend den Schritt des Inkontaktbringens der zu testenden Substanz mit ei-

nem Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 16 und/oder einem Polypeptid nach Anspruch 17.

21. Verfahren nach Anspruch 20, umfassend die folgenden Schritte:

- Erzeugung homogener Kanalpräparate mit Hilfe der Nukleinsäuremoleküle gemäß einem der Ansprüche 1 bis 16 und/oder des Polypeptids nach Anspruch 17, und

- Testen von Substanzen an dieser Kanalpräparation.

22. Kit zur Durchführung eines Verfahrens nach Anspruch 20 und/oder 21, umfassend mindestens eine Nukleinsäure gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 16 und/oder ein Polypeptid nach Anspruch 17.

23. Verfahren für die Erkennung einer Herz-/Kreislaufstörung, **dadurch gekennzeichnet**, daß eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 16 und/oder ein Polypeptid nach Anspruch 17 mit Patientenmaterial in Kontakt gebracht wird.

24. Verfahren nach Anspruch 23, umfassend den folgenden Schritt:

- Inkontaktbringen der Nukleinsäure des Patienten mit einer Nukleinsäure gemäß eine der Ansprüche 1 bis 16, so daß ein Signal erhalten wird, das die Anwesenheit und/oder Abwesenheit einer Ionenkanalsequenz anzeigt.

25. Verwendung einer oder mehrerer Nukleinsäuren nach einem der Ansprüche 1 bis 16 und/oder des Polypeptids nach Anspruch 17 für die Behandlung und/oder Prophylaxe von Herz/Kreislauf-Störungen, Bewußtseinsstörungen und/oder Schmerzzuständen.

26. Verwendung nach Anspruch 25, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Herz/Kreislauf-Störungen auf einer Fehlsteuerung des Sinusknotens beruhen.

27. Verwendung nach Anspruch 25, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Bewußtseinsstörungen auf einer Fehlfunktion in thalamischen Neuronen beruhen.

28. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend eine oder mehrere der Nukleinsäuren nach einem der Ansprüche 1 bis 16 und/oder des Polypeptids nach Anspruch 17.

29. Konstrukt, enthaltend eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 16.


30. Wirtszelle, enthaltend ein Konstrukt nach Anspruch 29.

31. Antikörper, der mit einem Polypeptid nach Anspruch 17 reagiert.

32. Nukleinsäureprobe, die spezifisch ist für eine Nukleinsäure gemäß Seq. ID Nr. 1, 2, 3, 4 und/oder 5.


Zusammenfassung

Sequenzen eines I_h -Ionenkanals und deren Verwendung



Die vorliegende Erfindung betrifft eine Nukleinsäure, vorzugsweise eine DNA, die mindestens einen Teil der Sequenz eines I_h -Ionenkanals umfaßt. Diese Sequenz kann z.B. von einer humanen DNA, einer Ratten-DNA, einer Rinder-DNA einer *Drosophila-melanogaster*-DNA oder einer Seeigel-DNA abgeleitet sein. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung ein mRNA-Molekül, das die entsprechenden Sequenzen umfaßt. Die Erfindung betrifft außerdem ein Polypeptid bzw. Protein, das von der Nukleinsäure kodiert wird.

Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäure und Proteine für ein Screeningverfahren und/oder Diagnoseverfahren sowie die dafür notwendigen Kits.



Schließlich betrifft die Erfindung die Verwendung einer oder mehrerer Nukleinsäuren und Proteine für die Behandlung und/oder Prophylaxe von Herz/Kreislaufstörungen sowie Bewußtseinsstörungen.



Abb. 1 A

Nukleinsäure- und abgeleitete Aminosäuresequenz der cDNA des I_h-Kanals aus Seeigelgonaden

Sequenz ID Nr. 4

CGGGAGAATAGTGCACCAAGGGATGCCCCGTGAAATATTAATTAAACGTTTTTAAGAACA -101
TCATCAAACCCGGGCCCCCATCATGAAGGAATAACAAGGCCTTCGAAAAGTATGGGAAACT -41
GGTCGGCAGGACATCAGCATTATTAATTCTAGGAAACTCATTATGGATAACAAGGAAACT 18
M D N K E T 6
AACGGAGAGCTAGAGCAGTCTGATGAGGCCGATCCGTCCGGTCAAACCTTGATGATGGG 78
N G E L E Q S D E A D P S G Q N L D D G 26
GAAACCGATAGCAAACAAGAAGAATCTCATCAACGTTAGCCCGCCAAAAACACCGCCA 138
E T D S K Q E E N L I N V S P P K T P P 46
GGTCCTCCTCCTCCTCTAAAGAATGGAGGAAGGGGTCAGAAACCGCCCAAAATCCCAATA 198
G P P P P L K N G G R G Q K P P K I P I 66
TGTCATCAAAATGGAAAGCTCCCCAAGGAAGTTGAATGGACAGAAGACAGAGGCGAAGAC 258
C H Q N G K L P K E V E W T E D R G E D 86
AGAAAGGATAGTCTCACTCTTCAATCAAAGCTAGATCACGGGGCATAACGGATGAGAAA 318
R K D S L T L Q S K L D H G A Y T D E K 106
CAGGATCTTCTAACATATCTTGACCGTCACGGCATCAACAGTCCAGTCAAGCTAACACCA 378
Q D L L T Y L D R H G I N S P V K L T P 126
GATGAAACTGGAGGGAGCAGTGCTTTGGATATTCTTGGGATTATTGAAGAGAGGGACACT 438
D E T G G S S A L D I L G I I E E R D T 146
GGTGCCTAGGCTCTGATCCCTCATCCACTATGCAGGCCATGGCTAAACCTGTAGGCTTT 498
G A L G S D P S S T M Q A M A K P V G F 166
CTGCAGAGGCAGCTATGGACTGTCCTCCAACCTTCAGACAATAGACTCTCCATGAAACTT 558
L Q R Q L W T V L Q P S D N R L S M K L 186
TTCGGAAGCAAGAAAGGGTTACAAAAGGAAAAATATCGGCTGAGGAAGGCGGGGTTCTT 618
F G S K K G L Q K E K Y R L R K A G V L 206
ATCATTATCCATGTAGTCATTTTCTAGATTTTACTGGGATCTACTGATGCTGTGCCTGATC 678
I I H P C S H F R F Y W D L L M L C L I 226
ATGGCAAACGTCATCCTCCTACCCGTCGTCATTACTTTCTTCCACAACAAGGACATGAGT 738
M A N V I L L P V V I T F F H N K D M S 246
ACGGGTTGGCTCATCTTTAATTGCTTCTCAGATACCTTCTTCATTCTCGATCTCATCTGC 798
T G W L I F N C F S D T F F I L D L I C 266
AACTTTCGGACCGGCATCATGAATCCGAAGTCGGCCGAACAGGTGATCCTCAACCCCCGT 858
N F R T G I M N P K S A E Q V I L N P R 286
CAAATCGCCTATCATTATCTCCGTTTCATGGTTCATCATCGATCTCGTGTCTTCCATCCCC 918
Q I A Y H Y L R S W F I I D L V S S I P 306

ATGGACTACATCTTCCTCCTCGCTGGCGGCCAGAACCGTCACTTCCTCGAGGTGTCCCGA	978
M D Y I F L L A G G Q N R H F L E V S R	326
<hr/>	
S4	
GCCCTCAAGATACTGCGCTTTGCCAAGCTCCTCAGTCTTCTTCGACTCCTGCGTCTGTCC	1038
A L K I L R F A K L L S L L R L L R L S	346
<hr/>	
AGGCTCATGCGGTTTCGTCAAGTCAATGGGAACAGGCCTTCAACGTAGCCAATGCCGTCATC	1098
R L M R F V S Q W E Q A F N V A N A V I	366
<hr/>	
S5	
CGGATCTGTAATCTAGTGTGTATGATGCTTCTGATTGGCCATTGGAATGGCTGCCTTCAA	1158
R I C N L V C M M L L I G H W N G C L Q	386
<hr/>	
TATCTCGTGCCCATGCTGCAAGAATACCCCGACCAATCATGGGTGCGCCATTAATGGCCTT	1218
Y L V P M L Q E Y P D Q S W V A I N G L	406
<hr/>	
Pore	
GAGCACGCTCATTTGGTGGGAGCAGTATACATGGGCACTCTTCAAAGCCCTTTCGCACATG	1278
E H A H W W E Q Y T W A L F K A L S H M	426
<hr/>	
CTCTGTATCGGGTACGGCAAGTTCCCCCCTCAAAGCATCACCGATGTCTGGCTAACGATT	1338
L C I G Y G K F P P Q S I T D V W L T I	446
<hr/>	
S6	
GTCAGTATGGTGTCCGGTGGGACCTGCTTCGCCCTGTTTCATCGGACACGCTACCAATCTC	1398
V S M V S G A T C F A L F I G H A T N L	466
<hr/>	
ATCCAGTCCATGGACTCCTCCAGCAGGCAATACCGTGAGAAGTTGAAACAAGTTGAAGAG	1458
I Q S M D S S S R Q Y R E K L K Q V E E	486
<hr/>	
TACATGCAGTATCGCAAGCTACCGTCCCACCTACGAAACAAGATCCTCGATTACTACGAG	1518
Y M Q Y R K L P S H L R N K I L D Y Y E	506
<hr/>	
TACCGATACCGAGGAAAGATGTTTGATGAGAGGCATATCTTTCGAGAAGTGTCGGAGAGT	1578
Y R Y R G K M F D E R H I F R E V S E S	526
<hr/>	
ATACGACAGGATGTCGCAAACTACAATTGTCGCGACCTGGTTCGCATCCGTCCCTTTCTTC	1638
I R Q D V A N Y N C R D L V A S V P F F	546
<hr/>	
GTCGGTGCCGACTCAAACCTTCGTACCCCGTGTGGTGACGCTGCTCGAATTTCGAGGTCTTC	1698
V G A D S N F V T R V V T L L E F E V F	566
<hr/>	
CAACCCGCTGACTATGTTATACAGGAAGGTACTTTTCGGTGATCGCATGTTCTTCATCCAG	1758
Q P A D Y V I Q E G T F G D R M F F I Q	586
<hr/>	
CAGGGCATCGTCGACATCATCATGTCCGACGGCGTCATCGCCACGTCACTCAGTGACGGC	1818
Q G I V D I I M S D G V I A T S L S D G	606
<hr/>	
cNMP-Bindestelle	
TCATATTTTGGCGAAATCTGCCTGCTTACCCGTGAGCGCCGCGTGGCATCGGTGAAGTGC	1878
S Y F G E I C L L T R E R R V A S V K C	626
<hr/>	
GAGACCTACTGCACGCTCTTCTCGCTCTCCGTCCAGCATTTCAACCAAGTGCTCGACGAG	1938
E T Y C T L F S L S V Q H F N Q V L D E	646

TTTCCCGCCATGAGGAAAACGATGGAAGAGATAGCCGTTTCGTCTGTGACCCGAATCGGG	1998
F P A M R K T M E E I A V R R L T R I G	666
AAGGAATCGAGCAAGCTGAAATCCCGCCTAGAGAGCCCGACGATCAGGGACACTGCCCCCT	2058
K E S S K L K S R L E S P T I R D T A P	686
CTCTTTCCGATCCCACCTGATACACCGTCTTTCGTACCGACATCGAAAAGAACCGGTTC	2118
L F P I P P D T P S F V T D I E K N R F	706
TTTGGCGACGACACGGACGATGTACACATCAGGACCCGAGTCGACGTCGAGCGTGGTTTCG	2178
F G D D T D D V H I R T R V D V E R G S	726
CATGAAAACGTCATCGCCATCATGGATGGGAGTTTATCCGACCTCAGGATGGAAAACGAA	2238
H E N V I A I M D G S L S D L R M E N E	746
ATCCAAGCCCGTAAATCGTCTAGCGGAAAACGGAGGAAATTCCAGCAACAAACAACCGAA	2298
I Q A R K S S S G K R R K F Q Q Q T T E	766
CTATGACGACTTGAAACAAACAATGATGGACGCTTACAATTTCCAGTGATTCAATACTTA	2358
L -	767
CGCAATGCAGACATTAGCTTTTGTACCTGATTGTTTAGAATGTATTGAATTTGTAGATCA	2418
GTCCGGCAAATAAGAAAGCATAATTTGGAATTTCTTTCATTGAGGAAGTACTGAAAACAA	2478
TGTGATAGCAGCCGGTAGAAATTTCTTGTCCATTATCGAGGCTATATTTTTTCGCGCTTTC	2538
TTACGAAGTAAATGAAAGGATCAATTAAATTATTGTTCTTTGTCTCGTGCGCTTTGTATC	2598
TGATGCCGAAAAGGAATGAAACGTGATTAGAACAGTAATCGATTGAACTACAGAAGTCTT	2658
TTCAAAATGTTGAATGTATGAAGGAGGAGGGGAAGGTTTGATATATGCAAAGAAATGGA	2718
GAAATATTTTTGTAAATTTATCTAGAATGGTACTATTGATGCTGGAAAGGTGTTGAAGTT	2778
GTCCAATATTGTGTCAAATCACCAACTATTTGACATTTGTCTTTTTTC	2825

	↓★																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
--	----	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Abb. 2

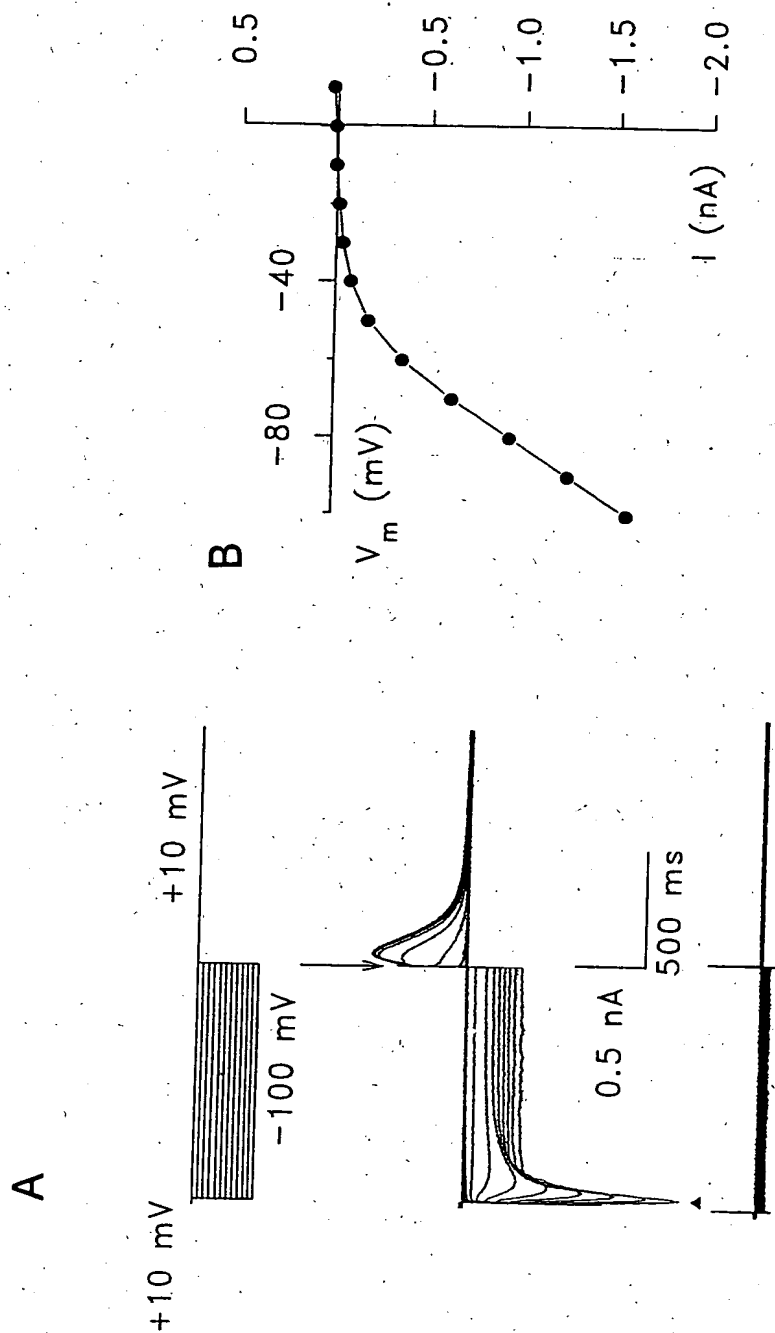
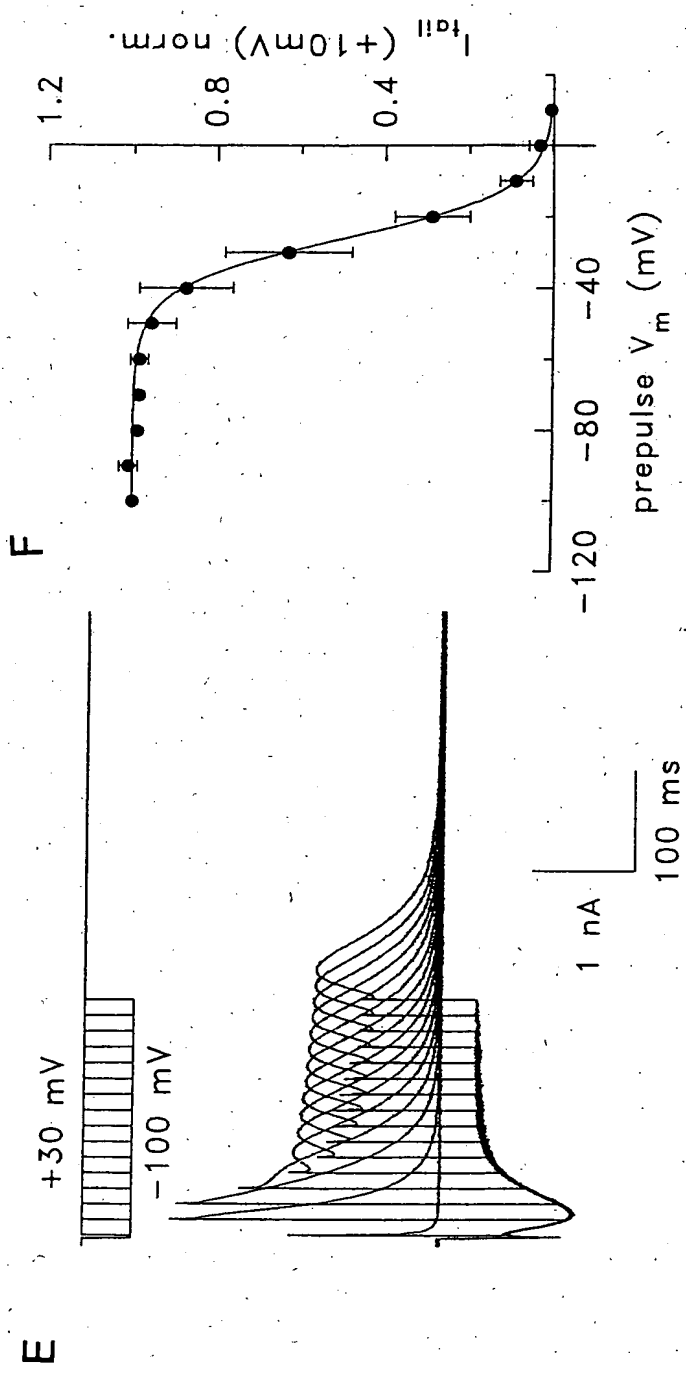


Abb. 2



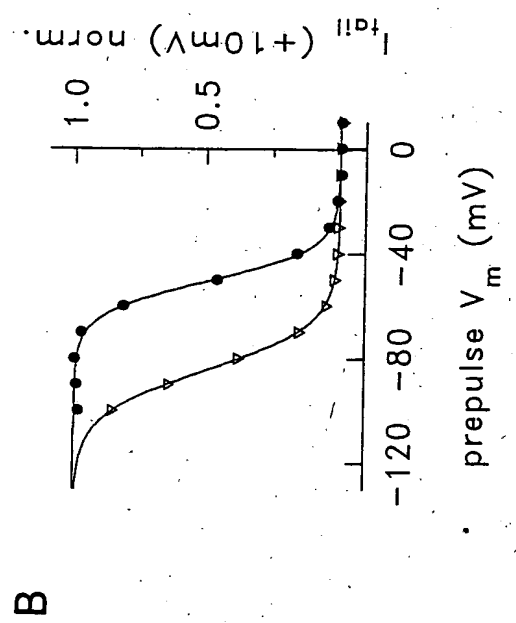
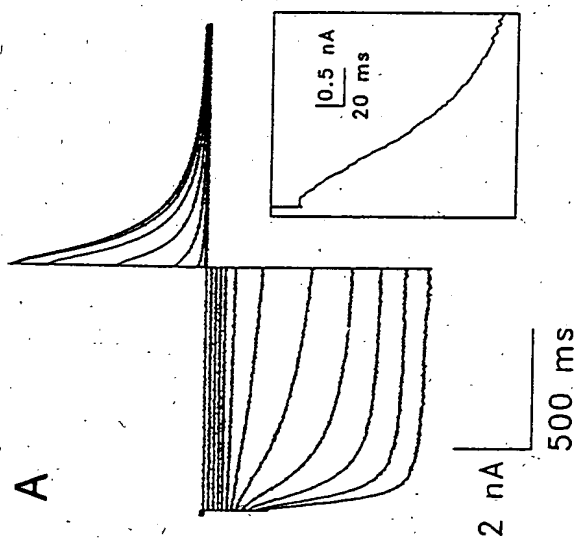
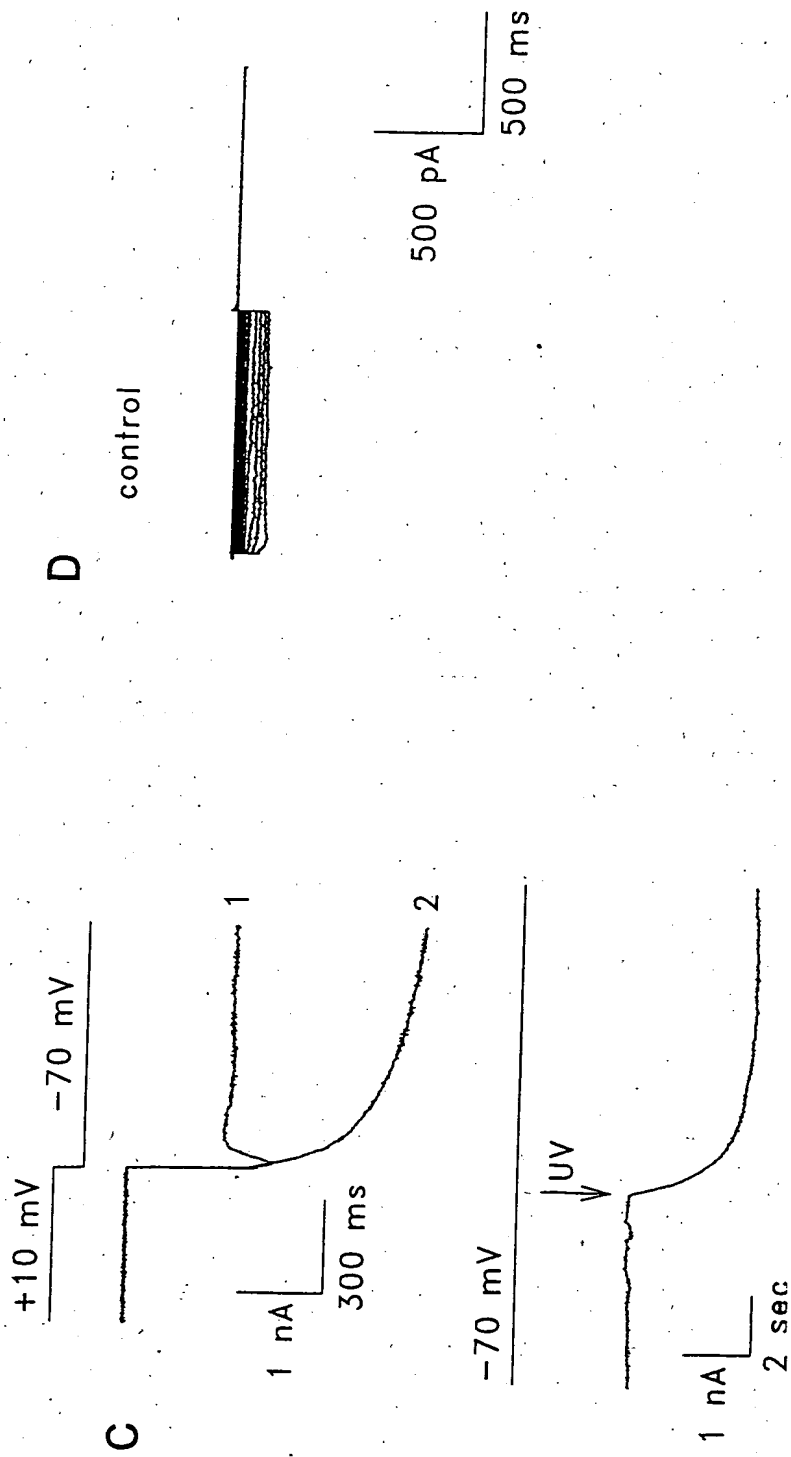


Abb. 3

Abb. 3

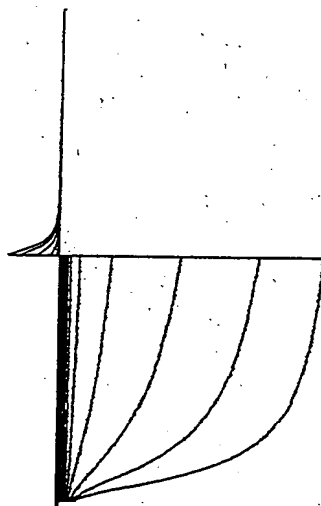


17-02-98

Abb. 3

E

1mM cAMP



F

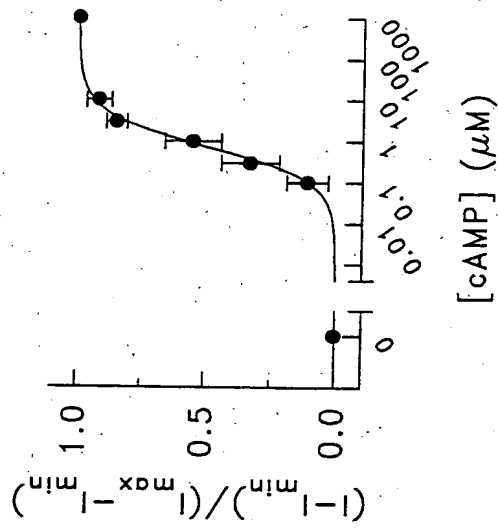


Abb. 4

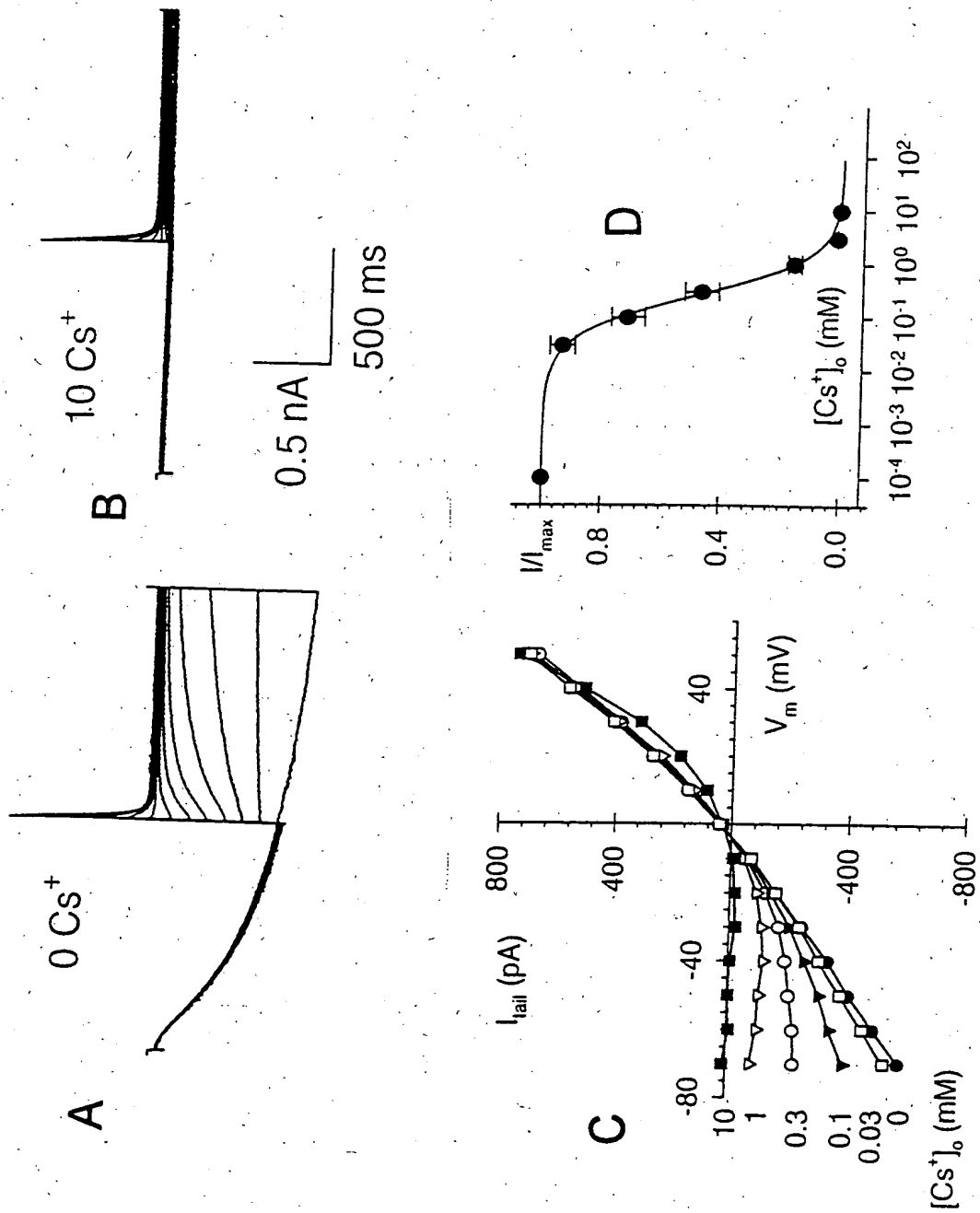
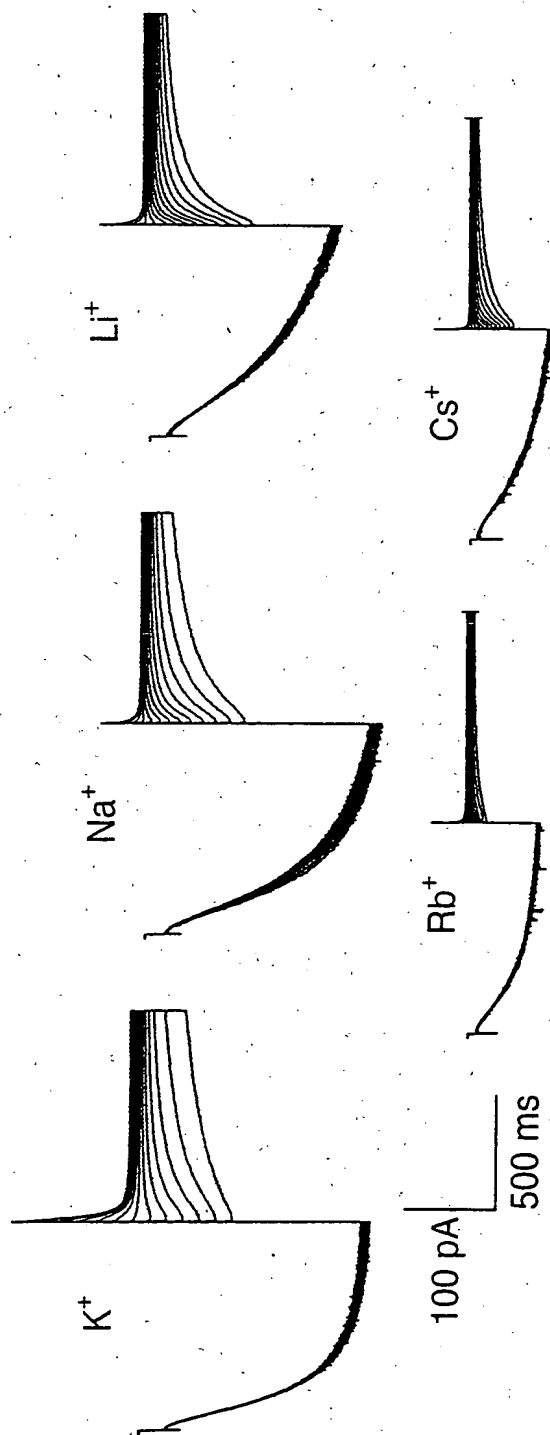


Abb. 4 E



170000

Abb. 4 F

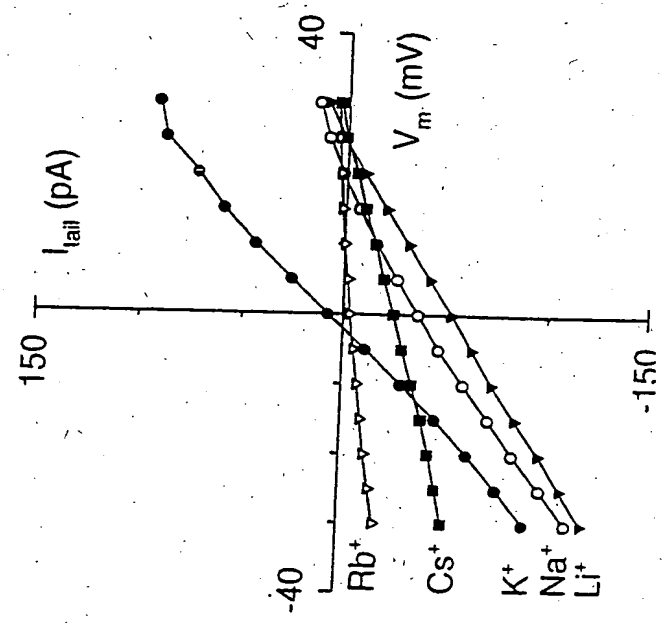


Abb. 4 G

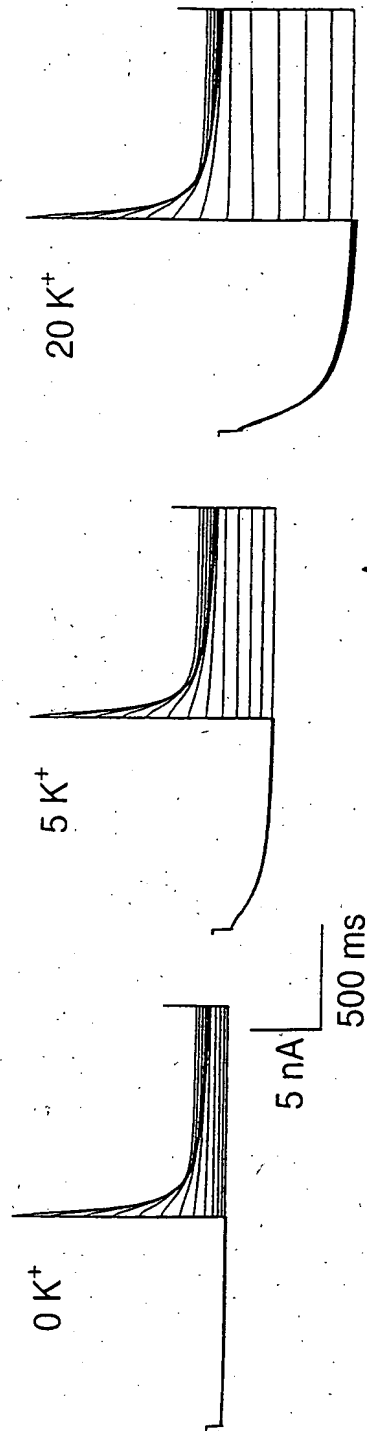


Abb. 4 H

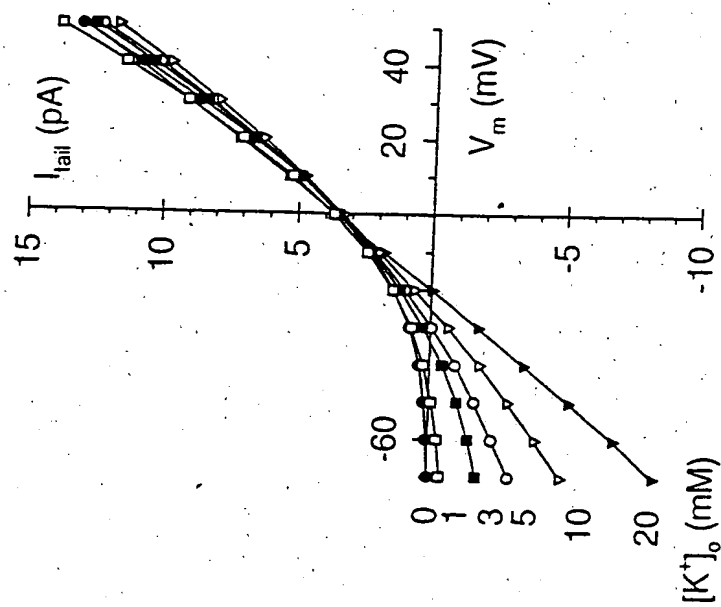


Abb. 5

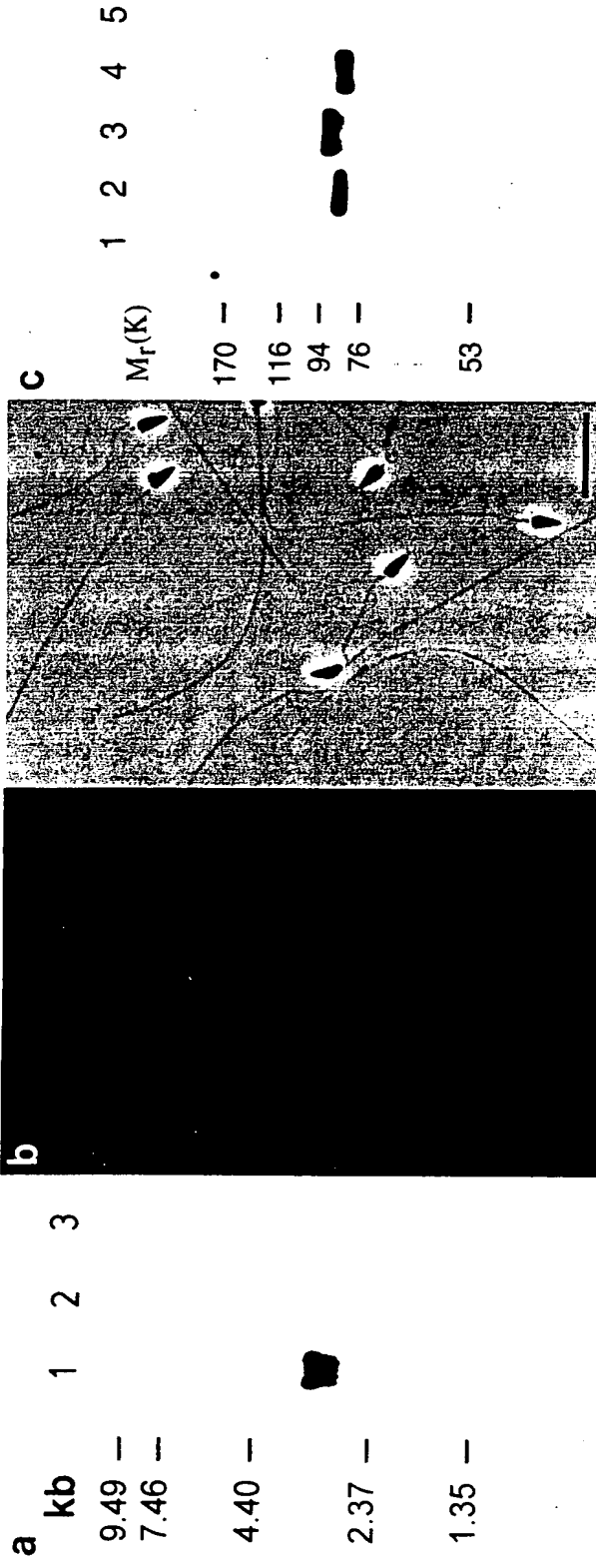
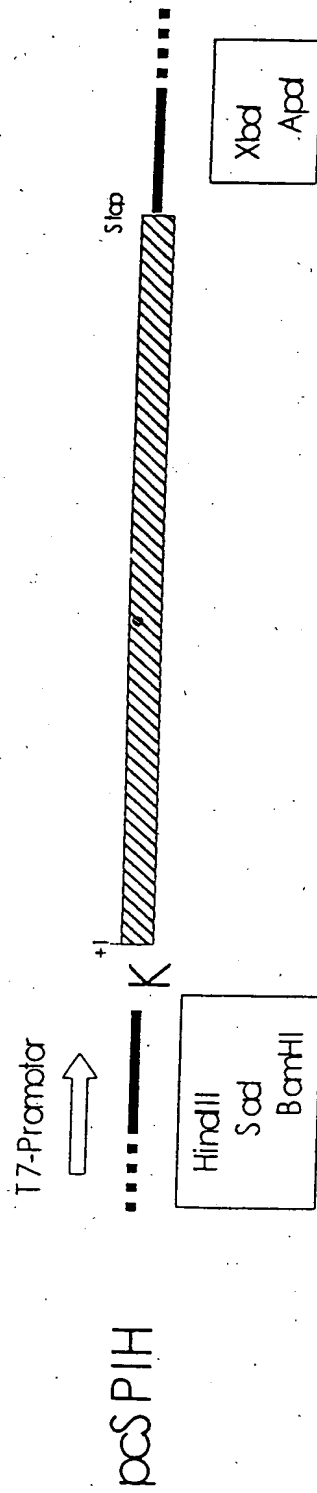


Abb. 6



SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Forschungszentrum Juelich GmbH
- (B) STRASSE: Leo-Brandt-Strasse
- (C) ORT: Juelich
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 52428

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Sequenzen eines I(h)-Ionenkanals und deren Verwendung

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 13

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1342 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

CGTTGCGCTT CACCAAGATC CTCAGCCTCC TCGGGCTGCT GCGCCTCTCA CGCCTGATCC	60
GCTACATCCA TCAGTGGGAG GAGATCTTCC ACATGACCTA TGACCTGGCC AGCGCGGTGA	120
TGAGGATCTG CAATCTCATC AGCATGATGC TGCTGCTCTG CCACTGGGAC GGCTGCCTGC	180
AGTTCCTGGT GCCCATGCTG CAGGACTTCC CGCGCAACTG CTGGGTGTCC ATCAATGGCA	240
TGGTAAACCA CTCGTGGAGT GAACTGTACT CCTTCGCACT CTTCAAGGCC ATGAGCCACA	300
TGCTGTGCAT CGGGTACGGC CGGCAGGCGC CCGAGAGCAT GACGGACATC TGGCTGACCA	360
TGCTCAGCAT GATTGTGGGT GCCACCTGCT ACGCCATGTT CATCGGCCAC GCCACTGCCC	420
TCATCCAGTC GCTGGACTCC TCGCGGCGCC AGTACCAGGA GAAGTACAAG CAGGTGGAGC	480
AGTACATGTC CTTCCACAAG CTGCCAGCTG ACTTCCGCCA GAAGATCCAC GACTACTATG	540
AGCACCGTTA CCAGGGCAAG ATGTTTGACG AGGACAGCAT CCTGGGCGAG CTCAACGGGC	600
CCCTGCGGGA GGAGATCGTC AACTTCAACT GCCGGAAGCT GGTGGCCTCC ATGCCGCTGT	660
TCGCCAACGC CGACCCCAAC TTCGTCACGG CCATGCTGAC CAAGCTCAAG TTCGAGGTCT	720
TCCAGCCGGG TGACTIONATC ATCCGCGAAG GCACCATCGG GAAGAAGATG TACTTCATCC	780
AGCACGGCGT GGTCAGCGTG CTCACTAAGG GCAACAAGGA GATGAAGCTG TCCGATGGCT	840
CCTACTTCGG GGAGATCTGC CTGCTCACCC GGGGCCGCCG CACGGCGAGC GTGCGGGCTG	900
ACACCTACTG CCGCCTCTAT TCGCTGAGCG TGGACAACTT CAACGAGGTG CTGGAGGAGT	960



ACCCCATGAT GCGGCGCGCC TTCGAGACGG TGGCCATCGA CCGCCTGGAC CGCATCGGCA	1020
AGAAGAATTC CATCCTCCTG CACAAGGTGC AGCATGACCT CAACTCGGGC GTATTCAACA	1080
ACCAGGAGAA CGCCATCATC CAGGAGATCG TCAAGTACGA CCGCGAGATG GTGCAGCAGG	1140
CCGAGCTGGG CTCAGCGCGT GGGCCTCTTC CCGCCGCCGC CGCCGCCGCC GCAGTCACCT	1200
CGGCCATCGC CACGCTGCAG CAGGCGGCGG CCATGAGCTT CTGCCCAGCAG TGGCGCGGCC	1260
GCTCGTGGGG CCGCTGGCGC TCGGCTCGCC GCGCCTCGTG CGCHGNCYNDY HCCCGGGGSC	1320
CGCACCTGCH GCCNCCTCAC CC	1342

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 3112 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

CCTGGTTCGT GGTGGACTTC ATCTCCTCGA TCCCGGTGGA TTATATCTTT CTTATTGTAG	60
AGAAAGGAAT GGATTCGGAA GTTTACAAGA CCGCCAGAGC ACTTCGGATC GTGAGGTTTA	120
CAAAAATTCT CAGTCTCTTG CGTTTATTAC GCCTTTCAAG GTTAATTAGA TACATACACC	180
AGTGGGAAGA GATATTCCAC ATGACATATG ATCTCGCCAG TGCAGTGGTG AGAATCTTCA	240
ACCTCATTGG CATGATGCTG CTCCTGTGTC ACTGGGATGG CTGTCTTCAG TTTCTGGTCC	300
CCCTGCTGCA GGACTTCCCA CCGGATTGCT GGGTTTCTCT AAATGAAATG GTTAATGATT	360
CATGGGGGAA ACAGTATTCC TACGCACTCT TCAAAGCTAT GAGTCACATG CTGTGCATTG	420
GTTATGGCGC CCAGGCCCCC GTCAGCATGT CTGACCTCTG GATTACCATG CTGAGCATGA	480
TTGTTGGGGC CACCTGCTAT GCCATGTTTG TCGGCCATGC CACAGCTTTG ATCCAGTCTC	540
TATTCTTC AAGGAGGCAG TATCAAGAGA AGTACAAGCA AGTAGAGCAA TACATGTCAT	600
TCCACAGTT ACCAGCTGAC ATGCGCCAGA AGATACATGA TTACTATGAG CACCGATACC	660
AAGGCAAGAT CTTCGATGAG GAAAATATTC TCAGTGAAC TAATGATCCT CTGAGAGAGG	720
AAATAGTCAA CTTCAACTGC CGGAAACTGG TGGCCACCAT GCCTCTCTTT GCTAACGCGG	780
ATCCCAATTT CGTGACGGCC ATGCTGAGCA AGCTGAGATT TGAGGTGTTC CAGCCCGGAG	840
ACTATATCAT TCGAGAAGGA GCTGTGGGGA AGAAAATGTA TTTCATCCAG CATGGTGTGG	900
CTGGTGTGTC CACCAAGTCC AGTAAAGAAA TGAAGTTGAC AGACGGCTCT TACTTTGGAG	960
AAATATGCCT GCTGACCAAG GGCCGGCGCA CTGCCAGTGT TCGAGCTGAT ACATACTGTC	1020
GCCTTTACTC CCTTTCGGTG GACAATTTCA ACGAGGTCTT GGAGGAATAT CCAATGATGA	1080
GAAGAGCCTT TGAGACAGTT GCTATTGACC GACTAGATCG GATAGGCAAG AAAA ACTCTA	1140
TTCTCCTGCA GAAGTTCCAG AAGGATCTGA ACACTGGTGT TTTCAACAAC CAGGAGAATG	1200
AGATCCTGAA GCAGATTGTG AAGCATGACA GAGAGATGGT ACAAGCGATC CCTCCAATCA	1260
ACTATCCTCA AATGACAGCC CTGAATTGCA CATCTTCAAC CACCACCCCA ACGTCGCGCA	1320

TGAGGACCCA	ATCTCCACCA	GTCTACACAG	CGACCAGCCT	CTCTCACAGC	AACCTGCACT	1380
CACCCAGCCC	CAGCACACAG	ACGCCTCAAC	CCTCAGCCAT	CCTTTTACCC	TGCTCCTACA	1440
CCACAGCAGT	CTGCAGTCCT	CCTATACAGA	GCCCCCTGGC	CACGCGAACT	TTCCATTATG	1500
CCTCTCCCAC	TGCATCCCAA	TTGTCACTCA	TGCAGCAGCC	TCAGCCGCAG	CTACAGCAAT	1560
ECCAGGTACA	GCAGACTCAG	CCGCAGCCGC	AGCCGCAGCC	GCAGCAGCCG	CAACAGCAAC	1620
AACAGCAGCA	ACAGCAGCAG	CAGCAGCAGC	AGCAACAACA	ACAGCAGCAG	CAACAGCCAC	1680
AGACACCTGG	TAGTTCCACA	CCGAAAAATG	AAGTGCACAA	GAGCACTCAA	GCTCTTCATA	1740
ACACCAACCT	GACCAGAGAA	GTCAGGCCCC	TCTCTGCCTC	GCAGCCTTCG	CTGCCCCATG	1800
AGGTCTCCAC	TATGATCTCC	AGACCGCATC	CCACTGTGGG	CGAGTCCCTG	GCCTCCATCC	1860
CTCAACCCGT	GGCAACAGTC	CACAGCACTG	GCCTTCAGGC	AGGGAGCAGG	AGCACCGTGC	1920
CACAGCGTGT	CACCTTGTTT	AGACAGATGT	CCTCGGGAGC	TATTTCCCCC	AACCGAGGAG	1980
TGCCTCCAGC	ACCCCCACCA	CCAGCAGCTG	TGCAGAGAGA	GTCTCCCTCA	GTCTTAAATA	2040
AAGAGCCAGA	TGCAGAAAAA	CCACGTTTTG	CTTCGAATTT	ATGATTCTTG	CTGATTGTCA	2100
AAGCAGAAAA	GAAATACTCT	AATAAACAGA	ATATTCTCAG	ATATTATTTT	ATTCTATCTC	2160
ATGATAGAGC	CCTATAGCCT	ACTCTAAAAA	GATATTTTAG	AAGCTCTGGC	GTACATGCAA	2220
ATGTAAAAAC	ATATATACAT	ATATTATTAA	ATATATATAT	ATATCTAAAT	GCCCAAGAGA	2280
AGTTCAAAAG	ACTTGTATAA	CTTTCAGTGT	TATGTCTTCC	TTTCTTTAAA	ACCATTAAG	2340
GATTTAACAC	ATTGTTGTAA	GATCATTGAT	TTCTAACCTT	TTACTTAATT	CCTTTGTTAT	2400
ATGTGTTTCT	CCCTTTTATG	AAGAGTTCTT	GAAGTCATTG	GAAACAAAAC	TCTGATTTAG	2460
AAATAAAAGG	CAACTCCAAT	TAGTTTCAGC	ATAGCACCAA	TCAAAGCTTT	CTTTCATTAA	2520
CTGTGCCTCT	GCATCTAGGT	TGTTAATTAT	GTGGGATTCA	ATAAAGAAAT	CCCAGTTTAT	2580
AGCTCTAAAT	TGTATTTTGG	TGCTTTAAAT	TTTGAGTTAT	GTGAAGGAAC	ACACTACACG	2640
CTCAGCCACC	ATAGGAGACT	AACATTGCCA	CTGTTAAGGC	TTCCTCTAAC	CTCAAACATG	2700
TTCTGTC AATT	TTGTGAGGAA	AGGTGAGGAG	ATATTTGTCT	TCATGTGTTA	TTGGACTTTT	2760
ACCAAGATTC	AGTCAATGTT	AGCTGTAAAT	AACTTTTCCA	ACCTGAATAA	AAGTAACTAT	2820
TCTGTGTTGT	ATAAAGGTAA	AAGTCACTGT	TTAAGAATTT	AGTTTTATTG	CTTCACTTCA	2880
AAAGTTAGAG	TTTTAAAATT	TCACAAAACA	TAATAATTGT	GACAACTGTT	CAAATGTAAT	2940
GCAATTGCTT	GAGACCTACA	ATATCATTTA	AACCTGCAAT	ATTTTATGCA	AAAATTGTAT	3000
GCTTGAACCT	ACAAATTGCT	TGTATTACAC	CAAAAATCAT	TACTTTTATT	CCTTCTTGAC	3060
ATAATCAAGC	ATCTGAACCT	AGTCCTGGCA	TGCTTTTGGG	GGCAAAAAAA	AA	3112

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 2606 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

CGGGAGCCCG	GAGCGCAGCC	ACTGAGGGCA	GCGGCGGCGG	CGGGAGCGAG	GCGCGCAGCG	60
AGAAGCGGCG	GCGAGGAATC	GGCCGGGGGC	TTCGAGGACG	CCGAGGGGCC	CCGGCGGCAG	120
TACGGCTTCA	TGCAGCGGCA	GTTACCTCC	ATGCTGCAGC	CCGGGGTCAA	CAAATTCTCC	180
CTCCGCATGT	TCGGGAGCCA	GAAGGCGGTG	GAGAAGGAGC	AGGAAAGGGT	TAAAACTGCA	240
GGCTTCTGGA	TTATCCACCC	TTACAGTGAT	TTCAGGTTTT	ATTGGGATTT	AATAATGCTT	300
ATAATGATGG	TTGGAAATCT	GGTCATCATA	CCAGTTGGAA	TCACATTCTT	TACAGAACAG	360
ACAACAACAC	CATGGATTAT	TTTCAATGTG	GCTTCAGATA	CAGTTTTCTT	TTTGGACTTG	420
ATCATGAATT	TCAGGACTGG	GACTGTCAAT	GAAGACAGTT	CTGAAATCAT	CCTGGACCCT	480
AAAGTGATCA	AGATGAATTA	TTTAAAAAGC	TGGTTTGTGG	TTGACTTCAT	CTCATCAATC	540
CCAGTGGATT	ATATCTTTCT	CATTGTAGAA	AAAGGAATGG	ATTCGGAAGT	TTACAAGACA	600
GCCAGGGCAC	TTCGCATTGT	GAGGTTTACA	AAAATTCTCA	GTCTCTTGCG	TTTATTACGA	660
CTTCAAGGT	TAATTAGATA	CATACATCAG	TGGGAAGAGA	TTTTCCACAT	GACATATGAT	720
CTTGCCAGTG	CTGTGGTGAG	AATTTTTAAC	CTCATTGGCA	TGATGCTGCT	CCTGTGCCAC	780
TGGGATGGCT	GTCTTCAGTT	CCTGGTACCA	CTGCTGCAGG	ACTTCCCACC	AGATTGCTGG	840
GTGTCTCTAA	ATGAGATGGT	TAATGATTCT	TGGGGAAAGC	AGTATTCCTA	CGCGCTCTTC	900
AAAGCGATGA	GTCATATGCT	GTGCATTGGC	TACGGAGCCC	AAGCCCCCGT	GAGCATGTCT	960
GACCTGTGGA	TCACCATGCT	GAGCATGATC	GTCGGGGCCA	CCTGCTACGC	CATGTTTGT	1020
GGCCACGCCA	CGGCTCTAAT	TCAGTCTTTG	GATTCCTCAA	GGCGGCAATA	TCAAGAGAAG	1080
TATAAGCAAG	TGGAACAATA	CATGTCATTC	CATAAGTTAC	CAGCTGATAT	GCGTCAGAAG	1140
ATACATGATT	ATTATGAACA	CAGATACCAA	GGCAAAATCT	TTGATGAGGA	AAATATTCTC	1200
AATGAACTCA	ATGATCCTCT	GAGAGAGGAG	ATAGTCAACT	TCAACTGCCG	AAAAC TAGTG	1260
GCTAATGC	CTCTTTTTGC	TAATGCGGAT	CCTAATTTCG	TGACCGCCAT	GCTGAGCAAG	1320
TTGAGATTTG	AGGTGTTTCA	ACCTGGAGAT	TATATCATAC	GAGAAGGAGC	TGTGGCTAAA	1380
AAAATGTATT	TCATTCAACA	TGGTGTGCT	GGTGTCATCA	CAAAATCCAG	TAAAGAAATG	1440
AAGCTGACAG	ATGGCTCATA	CTTTGGAGAG	ATTTGCTTGC	TGACCAAGGG	ACGGCGCACT	1500
GCCAGTGTTT	GAGCTGATAC	ATATTGTCGT	CTTTACTCAC	TTTCTGTGGA	CAATTTCAAT	1560
GAGGTCCTGG	AGGAATATCC	AATGATGAGA	AGAGCCTTTG	AGACGGTTGC	CATTGACCGA	1620
TTAGATAGGA	TAGGGAAGAA	AAATTCAATT	CTCCTGCAAA	AGTTCCAGAA	GGATCTGAAC	1680
ACGGGTGTTT	TCAACAATCA	GGAGAACGAG	ATCCTGAAGC	AGATTGTGAA	ACACGACAGG	1740
GAAATGGTGC	AGGCAATCCC	TCCCCTCAAT	TACCCTCAAA	TGACAGCCCT	GAATTCACC	1800
TCTTCAACTA	CTACCCCGAC	CTCTCGCCTG	AGGACACAGT	CACCGCCAGT	GTACACAGCC	1860
ACCAGTCTGT	CTCATAGCAA	CCTGCACTCC	CCCAGCCCCA	GCACCCAGAC	CCCCAGCCG	1920
TCAGCCATCC	TCTCGCCCTG	CTCCTACACC	ACCGCTGTCT	GCAGCCCTCC	TGTACAGAGC	1980

CCGCTAGCCA	CTCGAACTTT	CCACTATGCC	TCCCCCACGG	CTTCCCAGTT	GTCCCTCATT	2040
CAGCAGCAGC	AGGTTCAGCA	GCCACCGCAG	CCCCAGCAGC	CACCCCAACC	TCCACAGACC	2100
CCCGGCAGCT	CCACACCGAA	AAACGAAGTG	CACAAGAGCA	CGCAGGCGCT	TCACAACACC	2160
AGCCTGACCC	GAGAAGTCAG	GCCCCTCTCG	GCCTCGCAGC	CCTCGCTGCC	CCACGAGGTC	2220
TCCACCCTGA	TCTCCAGACC	GCATCCCCT	GTGGGCGAGT	CCCTGGCCTC	CATCCCTCAA	2280
CCCGTGACCA	CGGTCCACGG	CTCGGGCCTG	CAGGCAGGGG	GCAGGGGCAC	CGTCCCCCAG	2340
CGAGTCACCC	TGTTCCGACA	GATGTCATCG	GGAGCCATCC	CCCCCAATCG	AGGAGTCCCC	2400
CCGGCCCCCC	CTCCACCAGC	AGCCGCTCAT	CCGAGGGAGG	CGCCCTCAGT	CTTAACTACA	2460
GACTCAGAGG	CAGAAAAGCC	ACGATTTGCT	TCAAATTTAT	GATCCTGCTG	ATTGTAAAGC	2520
AGAAAGAAAT	ACTCTAACGT	AACTGAGGAC	GCTTCTCAGA	TTTGATTTTA	TTCTATCTCC	2580
TGATAGATCC	TCTAGCCTAC	TATGAA				2606

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 2935 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

ATCAAACCCG	GGCCCCATCA	TGAAGGAATA	ACAAGGCCTT	CGAAAAGTAT	GGGAAACTGG	60
TCGGCAGGAC	ATCAGCATTA	TTAATTCTAG	GAAACTCATT	ATGGATAACA	AGGAAACTAA	120
CGGAGAGCTA	GAGCAGTCTG	ATGAGGCCGA	TCCGTCCGGT	CAAACCTTG	ATGATGGGGA	180
AACCGATAGC	AAACAAGAAG	AGAATCTCAT	CAACGTTAGC	CCGCCAAAAA	CACCGCCAGG	240
TCCTCCTCCT	CCTCTAAAGA	ATGGAGGAAG	GGGTCAGAAA	CCGCCAAAAA	TCCCAATATG	300
TCATCAAAAT	GGAAAGCTCC	CCAAGGAAGT	TGAATGGACA	GAAGACAGAG	GCGAAGACAG	360
AAAGGATAGT	CTCACTCTTC	AATCAAAGCT	AGATCACGGG	GCATACACGG	ATGAGAAACA	420
GGATCTTCTA	ACATATCTTG	ACCGTCACGG	CATCAACAGT	CCAGTCAAGC	TAACACCAGA	480
TGAAACTGGA	GGGAGCAGTG	CTTTGGATAT	TCTTGGGATT	ATTGAAGAGA	GGGACACTGG	540
TGCACTAGGC	TCTGATCCCT	CATCCACTAT	GCAGGCCATG	GCTAAACCTG	TAGGCTTTCT	600
GCAGAGGCAG	CTATGGACTG	TCCTCCAACC	TTCAGACAAT	AGACTCTCCA	TGAAACTTTT	660
CGGAAGCAAG	AAAGGGTTAC	AAAAGGAAAA	ATATCGGCTG	AGGAAGGCGG	GGGTTCTTAT	720
CATTCATCCA	TGTAGTCATT	TCAGATTTTA	CTGGGATCTA	CTGATGCTGT	GCCTGATCAT	780
GGCAAACGTC	ATCCTCCTAC	CCGTCGTCAT	TACTTTCTTC	CACAACAAGG	ACATGAGTAC	840
GGGTTGGCTC	ATCTTTAATT	GCTTCTCAGA	TACCTTCTTC	ATTCTCGATC	TCATCTGCAA	900
CTTTCGGACC	GGCATCATGA	ATCCGAAGTC	GGCCGAACAG	GTGATCCTCA	ACCCCGTCA	960
AATCGCCTAT	CATTATCTCC	GTTTCATGGT	CATCATCGAT	CTCGTGTCTT	CCATCCCCAT	1020
GGACTIONATC	TTCCTCCTCG	CTGGCGGCCA	GAACCGTCAC	TTCCTCGAGG	TGTCCCGAGC	1080

CCTCAAGATA	CTGCGCTTTG	CCAAGCTCCT	CAGTCTTCTT	CGACTCCTGC	GTCTGTCCAG	1140
GCTCATGCGG	TTCGTCAGTC	AATGGGAACA	GGCCTTCAAC	GTAGCCAATG	CCGTCATCCG	1200
GATCTGTAAT	CTAGTGTGTA	TGATGCTTCT	GATTGGCCAT	TGGAATGGCT	GCCTTCAATA	1260
TCTCGTGCCC	ATGCTGCAAG	AATACCCCGA	CCAATCATGG	GTCGCCATTA	ATGGCCTTGA	1320
GCACGCTCAT	TGGTGGGAGC	AGTATACATG	GGCACTCTTC	AAAGCCCTTT	CGCACATGCT	1380
CTGTATCGGG	TACGGCAAGT	TCCCCCTCA	AAGCATCACC	GATGTCTGGC	TAACGATTGT	1440
CAGTATGGTG	TCCGGTGC GA	CCTGCTTCGC	CCTGTTCATC	GGACACGCTA	CCAATCTCAT	1500
CCAGTCCATG	GA CTCTCCA	GCAGGCAATA	CCGTGAGAAG	TTGAAACAAG	TTGAAGAGTA	1560
CATGCAGTAT	CGCAAGCTAC	CGTCCCACCT	ACGAAACAAG	ATCCTCGATT	ACTACGAGTA	1620
CCGATACCGA	GGAAAGATGT	TTGATGAGAG	GCATATCTTT	CGAGAAGTGT	CGGAGAGTAT	1680
ACGACAGGAT	GTCGCAAAC T	ACAATTGTCTG	CGACCTGGTC	GCATCCGTCC	CTTTCTTCGT	1740
CGGTGCCGAC	TCAAAC TTCG	TCACCCGTGT	GGTGACGCTG	CTCGAATTCG	AGGTCTTCCA	1800
ACCCCTGAC	TATGTTATAC	AGGAAGGTAC	TTTCGGTGAT	CGCATGTTCT	TCATCCAGCA	1860
GGGCATCGTC	GACATCATCA	TGTCCGACGG	CGTCATCGCC	ACGTCAC TCA	GTGACGGCTC	1920
ATATTTTGGC	GAAATCTGCC	TGCTTACCCG	TGAGCGCCGC	GTGGCATCGG	TGAAGTGCGA	1980
GACCTACTGC	ACGCTCTTCT	CGCTCTCCGT	CCAGCATTTT	AACCAAGTGC	TCGACGAGTT	2040
TCCCGCCATG	AGGAAAACGA	TGGAAGAGAT	AGCCGTTCTG	CGTCTGACCC	GAATCGGGAA	2100
GGAATCGAGC	AAGCTGAAAT	CCCGCCTAGA	GAGCCCGACG	ATCAGGGACA	CTGCCCCTCT	2160
CTTTCCGATC	CCACCTGATA	CACCGTCTTT	CGTCACCGAC	ATCGAAAAGA	ACCGGTTCTT	2220
TGGCGACGAC	ACGGACGATG	TACACATCAG	GACCCGAGTC	GACGTCGAGC	GTGGTTCGCA	2280
TGAAAACGTC	ATCGCCATCA	TGGATGGGAG	TTTATCCGAC	CTCAGGATGG	AAAACGAAAT	2340
CCAAGCCCGT	AAATCGTCTA	GCGGAAAACG	GAGGAAATTC	CAGCAACAAA	CAACCGAACT	2400
ATGACGACTT	GAAACAAACA	ATGATGGACG	CTTACAATTT	CCAGTGATTC	AATACTTACG	2460
CAATGCAGAC	ATTAGCTTTT	GTACCTGATT	GTTTAGAATG	TATTGAATTT	GTAGATCAGT	2520
CCGGCAAATA	AGAAAGCATA	ATTTGGAATT	TCTTTCATTG	AGGAAGTACT	GAAAACAATG	2580
TGATAGCAGC	CGGTAGAAAT	TTCTTGTTCCA	TTATCGAGGC	TATATTTTTT	GCGCTTTCTT	2640
ACGAAGTAAA	TGAAAGGATC	AATTAAATTA	TTGTTCTTTG	TCTSSTGCGC	TTTGTATCTG	2700
ATGCCGAAAA	GGAATGAAAC	GTGATTAGAA	CAGTAATCGA	TTGAACTACA	GAAGTCTTTT	2760
CAAAATGTTG	AATGTATGAA	GGAGGAGGGG	GAAGGTTTGA	TATATGCAAA	GAAATGGAGA	2820
AATATTTTTG	TAAATTTATC	TAGAATGGTA	CTATTGATGC	TGGAAAGGTG	TTGAAGTTGT	2880
CCAATATTGT	GTCAAATCAC	CAACTATTTG	ACATTTGTCT	TTTTCCCGGA	ATTCC	2935

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 3185 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

CGGAATTTCC	TCGCTGAAGG	GCAAGGGGCA	GAGTCAGAGT	CAGGGGCAGA	GCGGCAGACG	60
CTGCCCCGGCC	ATCGCGGGTC	GGTGAGGAGC	GAGAGTGGAA	GCGGGAGCAG	CCACACCATT	120
CCGGCGACGG	GCAAGAGTCC	GCCGGTGCCG	CACTCGCTGG	CGGCCAAGAT	CAGCAGCTCG	180
GCAAGCGGCA	GCAAGAACTG	CAATTTGCTC	AGCGCCAGCA	GCAACTCATG	CCACAAGCTG	240
AACGCCCACG	CCCAAGGATC	GGAGCAGGAT	CGGGATCTTG	GATCGGGATC	AGGATCAGGA	300
CCACCCGGAC	ACAGTCACTA	CGCGGCCGCC	TCGCCCAAAA	GCTCGGTCAG	CAGCAACGGT	360
CATCTGAACA	AGTACTGCCT	CACGGACCTC	ACGCGCCGCA	ACGCGAGTTC	AATCGCCAGC	420
TGAGCGCGCC	CACGGACTAC	ACGCACCACT	CCTCCAGCAA	CGGATCGCAG	CAGGAGGGCT	480
CCTCGGAGGC	CAACGAGGGC	CACGAACCGG	TCGGCGAGTC	CACCATCACC	GTAGCCAGTG	540
CCGGCGTATC	GTATCCGCAT	CCGTACTCCT	ATCCGTATCA	TTACGGCACC	ACCGCTCCTC	600
GGCCACAGCG	CCGGCCAATC	TCAAGGCGTC	GCTGCAGCTG	CACAGCTTTG	GGAGCCACCA	660
TCCGTGTCCT	TATCCGGCAA	GGCCCACGTC	CACGTCGTGC	ACCAACAGCT	TCAACCGGCG	720
CCACATTCGC	CGGCACAAGG	GCAAGCTCGG	CGATCGACTG	CTGAGCGGGG	ATAGTGAGGA	780
ATCGGTGCGC	TGCTCCTATT	GCTCGGTGCT	GAATGCGAAC	GACAACGACC	TGCGCATTTC	840
GTTTCGAGAAC	ACCTGCACCG	ATTCGCTGGT	AACCGCTTTC	GATGATGAAG	CCCTGCTAAT	900
ATGCGACCAA	GGAACCGAAA	TGGTACACTT	TGATGACGTG	TCGTTGTACG	GCACTCCGAA	960
AGAGGAGCCC	ATGCCCAACA	TACCGATCGT	GTCGGAAAAA	GTCTCTGCGA	ATTTCTTAAA	1020
AAGTCAATTG	CAATCATGGT	TCCAGCCGAC	GGACAACCGA	CTGGCCATGA	AACTGTTTGG	1080
CAGCCGAAAG	GCGCTGGTCA	AGGAGCGCAT	ACGTCAGAAA	ACTTCCGGGC	ACTGGGTCAT	1140
ACACCCGTGC	AGTTCATTCA	GGTTTTACTG	GGACCTTTGC	ATGCTTTTAT	TATTAGTAGC	1200
AAATCTATT	ATCCTGCCAG	TCGCAATATC	ATTCTTCAAC	GATGATCTGA	GCACACGATG	1260
GATTGCCTTC	AACTGCCTAA	GTGATACTAT	TTTTTTAATA	GATATTGTAG	TCAATTTTAG	1320
AACAGGAATT	ATGCAACAAG	ACAACGCTGA	ACAAGTAATA	TTGGATCCAA	AGCTTATAGC	1380
TAAACACTAT	TTAAGAACTT	GGTTTTTTCT	CGATTTGATT	TCGTCGATAC	CGCTAGATTA	1440
TATATTTTTTA	ATTTTCAATC	AAATTATGAA	ATTGCAGGAT	TTCTCTGATT	CTTTTCAAAT	1500
ATTGCATGCC	GGACGCGCCC	TGCCGATCCT	GCGCCTGGCC	AAGCTGTTAT	CCCTGGTGCG	1560
ACTGCTCCGC	CTTTCCCGCC	TCGTCCGCTA	CGTTTCCCAA	TGGGAGGAGG	TCTATTTCCCT	1620
CAATATGGCC	TCGGTCTTCA	TGAGGATCTT	CAATTTAATT	TGCATGATGC	TCCTGATCGG	1680
CCATTGGAGC	GGTTGCTTGC	AGTTCTTAGT	GCCAATGTTG	CAGGGTTTTT	CATCCAACCTC	1740
CTGGGTCTCC	ATCAACGAGT	TGCAGGAATC	GTACTGGCTG	GAGCAGTATT	CGTGGGCATT	1800
GTTCAAGGCC	ATGTCGCACA	TGCTCTGCAT	AGGCTACGGC	AGATTCCCGC	CACAATCACT	1860
GACAGACATG	TGGCTGACGA	TGCTATCGAT	GATATCCGGG	GCCACCTGTT	ACGCATTGTT	1920

CCTCGGTCAC	GCGACCAATC	TCATCCAGAG	CTTGGACTCC	AGCCGGCGCC	AGTATCGCGA	1980
GAAGGTCAAA	CAGGTGGAGG	AGTACATGGC	CTACCGCAAG	CTGCCACGCG	ACATGCGGCA	2040
GCGCATCACG	GAATATTTTCG	AGCATCGGTA	CCAGGGTAAA	TTCTTCGATG	AAGAGTTGAT	2100
ACTTGGCGAG	TTGAGCGAAA	AACTGCGCGA	GGATGTCATC	AACTACAACT	GCAGATCCCT	2160
CGTGGCGTCA	GTGCCTTTTT	TTGCTAATGC	CGATTCTGAAT	TTCGTTTCCG	ACGTAGTTAC	2220
CAAAC TGAAA	TACGAAGTTT	TCCAACCAGG	TGATATTATC	ATAAAGGAGG	GTACGATCGG	2280
TACTAAGATG	TACTTCATAC	AGGAGGGCGT	GGTGGACATT	GTCATGGCCA	ACGGCGAGGT	2340
TGCCACCTCA	CTTTCGGATG	GGTCTTATTT	CGGTGAGATC	TGTCTGCTGA	CCAATGCGCG	2400
TCGTGTGGCC	AGCGTGCGAG	CCGAAACCTA	TTGCAGTCTA	TTCTCGTTGA	GCGTGGATCA	2460
TTTCAATTGC	GTTCTGGATC	AGTATCCGCT	GATGCGCAAG	ACCATGGAGA	CTGTGGCCGC	2520
CGAGCGGTTA	AACAAGATCG	GCAAGAATCC	AAACATAATG	CATCAGAAGG	ACGAGCAGCT	2580
GAGCAATCCG	GAGTCGAACA	CGATTACGGC	TGTGGTTAAT	GCACTGGCTG	CCGAGGCGGA	2640
TGACTGCAAA	GATGATGACA	TGGATCTCAG	GGAGAATTTA	CTGCATGGGT	CAGAGTCGAG	2700
CATTCTGAG	CCGGTGCAGA	CGATACGTGA	GGGTCTCCCG	AGGCCACGGA	GCGGGGAGTT	2760
CCGGGCCTTG	TTCGAGGGTA	ACACTCCATG	ACACTGAGGA	GCAGTGACAA	GCGGTGCCCT	2820
CGGGCACCGG	GCAACCATCT	GAAGCAGCAG	TTGCTGGAC	ACTCACTCAC	CAAGTCCCAC	2880
ATCCATACTC	CACACAGGAC	TACCACTCAC	ACACACACAC	ACACTGCGTA	TATAATAATT	2940
TAGTAAAGG	AACCCCAAGA	CGCGATAAGA	GTACACTAAA	AAAAGAATCA	ATTTATGGTA	3000
GACACTCTAT	ATATGCAATT	GCGATTTAGT	AGAAAACGTA	TTAAAAACTA	AAAACCCAAA	3060
AAAAGAAGAT	AAAAACAATT	ACACAAAAAA	TGTCCTCAAT	AATTATTCAT	AATTTTCAGCT	3120
CCGCTAACTG	TGATGACTTT	AATATAAGAA	TCGAAAAAAA	AATTAACAAA	CAAACAAAAA	3180
AAAAG						3185

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 2922 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

CGGGAGCCCG	GAGCGCAGCC	ACTGAGGGCA	GCGGCGGCGG	CGGGAGCGAG	GCGCGCAGCG	60
AGAAGCGGCG	GCGAGGAATC	GGCCGGGGGC	TTGAGGACG	CCGAGGGGCC	CCGGCGGCAG	120
TACGGCTTCA	TGCAGCGGCA	GTTACCTCC	ATGCTGCAGC	CCGGGGTCAA	CAAATTCTCC	180
CTCCGCATGT	TCGGGAGCCA	GAAGGCGGTG	GAGAAGGAGC	AGGAAAGGGT	TAAACTGCA	240
GGCTTCTGGA	TTATCCACCC	TTACAGTGAT	TTCAGGTTTT	ATTGGGATTT	AATAATGCTT	300
ATAATGATGG	TTGGAAATCT	GGTCATCATA	CCAGTTGGAA	TCACATTCTT	TACAGAACAG	360
ACAACAACAC	CATGGATTAT	TTTCAATGTG	GCTTCAGATA	CAGTTTTCTT	TTTGGACTTG	420

ATCATGAATT	TCAGGACTGG	GACTGTCAAT	GAAGACAGTT	CTGAAATCAT	CCTGGACCCCT	480
AAAGTGATCA	AGATGAATTA	TTTAAAAAGC	TGGTTTGTGG	TTGACTTCAT	CTCATCAATC	540
CCAGTGGAAT	ATATCTTTCT	CATTGTAGAA	AAAGGAATGG	ATTGCGAAGT	TTACAAGACA	600
GCCAGGGCAC	TTCGCATTGT	GAGGTTTACA	AAAATTCTCA	GTCTCTTGCG	TTTATTACGA	660
CTTTCAAGGT	TAATTAGATA	CATACATCAG	TGGGAAGAGA	TTTTCCACAT	GACATATGAT	720
CTTGCCAGTG	CTGTGGTGAG	AATTTTTTAA	CTCATTGGCA	TGATGCTGCT	CCTGTGCCAC	780
TGGGATGGCT	GTCTTCAGTT	CCTGGTACCA	CTGCTGCAGG	ACTTCCCACC	AGATTGCTGG	840
GTGTCTCTAA	ATGAGATGGT	TAATGATTCT	TGGGGAAAGC	AGTATTCCTA	CGCGCTCTTC	900
AAAGCGATGA	GTCATATGCT	GTGCATTGGC	TACGGAGCCC	AAGCCCCCGT	GAGCATGTCT	960
GACCTGTGGA	TCACCATGCT	GAGCATGATC	GTGCGGGCCA	CCTGCTACGC	CATGTTTGTT	1020
GGCCACGCCA	CGGCTCTAAT	TCAGTCTTTG	GATTCTCTCA	GGCGGCAATA	TCAAGAGAAG	1080
TATAAGCAAG	TGGAACAATA	CATGTCATTC	CATAAGTTAC	CAGCTGATAT	GCGTCAGAAG	1140
ATAGTGGATT	ATTATGAACA	CAGATACCAA	GGCAAAATCT	TTGATGAGGA	AAATATTCTC	1200
AATGAACTCA	ATGATCCTCT	GAGAGAGGAG	ATAGTCAACT	TCAACTGCCG	AAAAGTAGTG	1260
GCTACAATGC	CTCTTTTTTG	TAATGCGGAT	CCTAATTTCT	TGACCGCCAT	GCTGAGCAAG	1320
TTGAGATTTG	AGGTGTTTCA	ACCTGGAGAT	TATATCATAC	GAGAAGGAGG	CTGTGGTAAA	1380
AAAATGTATT	TCATTCAACA	TGGTGTTGCT	GGTGTCATCA	CAAAATCCAG	TAAAGAAATG	1440
AAGCTGACAG	ATGGCTCATA	CTTTGGAGAG	ATTTGCTTGC	TGACCAAGGG	ACGGCGCACT	1500
GCCAGTGTTT	GAGCTGATAC	ATATTGTCGT	CTTTACTCAC	TTTCTGTGGA	CAATTTCAAT	1560
GAGGTCCTGG	AGGAATATCC	AATGATGAGA	AGAGCCTTTG	AGACGGTTGC	CATTGACCGA	1620
TTAGATAGGA	TAGGTACTGT	TTATTTTCTT	CTTTACTTAC	AATTCACTTT	TAATCTAGTG	1680
GTTGAGTATA	TATTTGCAGT	CATAAGTCCC	AAATGCTAGT	TTACAGATTG	CTTATTAACT	1740
AGCATAGAAA	CAGCAATTAG	CTGTAGCCAT	ATTTCTAGAA	GATCTGAGGC	ACTAACTTCT	1800
CGTCTTAGTA	TTCTAGGTTT	GTTTATTCAT	CTCTGTTTTT	ACTAGCTTCA	CAGTCTGATT	1860
TCCTCAGTGA	TACCAAAAGG	TAAAACCAAT	GATTACAAAT	TCTAGATGGC	ATTAAAATAG	1920
WWCTNAAAAA	TACAATAGTA	TGAGTCTACA	TTACAAACTA	TATTTTATNA	CAAGTTTTTT	1980
TTTTAANNNT	AAGGGTCAAC	ATTACATTTA	TTCTTATATT	AAGAATTGAA	AAGAATTGTG	2040
CATTTTACTT	GTCACAGTAG	AAACGTTAAT	GTTTGTAATA	CRRRCTCAAG	CAGAAAAAGC	2100
CTTAATAGAA	CTGCCACAT	AGATGCTTTA	TTTTGCAAAC	ATCAACTTAT	TTTAAAATCT	2160
TTCTTGCTCT	CAAATTAAAA	TATTGATATA	TAAGGCCTTA	CTAGTTATAC	TAGTTTAAAC	2220
GTCTGAATAA	TTGCCATGTA	AAAATTAGAT	CAGATTGGCT	TGCTGTTAAC	TTCCCAAGAT	2280
ATGCTGGAAC	ATTCTGATGT	CAGAAGGTGG	TATGCATTCA	TTTTCCACAC	CCAAATTCTC	2340
CTCCCCGACC	AGACCCTTCT	CTGCTCCCTT	TCCCAGCTTA	ACTCTACTAG	CCTTCATAGT	2400
TCAATTTAAA	CATCATTTCC	CTGTAGAAAC	CNATNGACCT	TCCACTCCTC	CTTAATRRTA	2460
TGAGCACCCCT	GGATATGTTT	TNCCATACCC	CTGGGATGTT	CCTCCATCAC	AGTACAGNTT	2520

TTATTATTTA AATTGCTCTA GAGATNCTAA GCTTTATGAA TNAAGAGATC ANGTCTAATT	2580
CACTATTACA TTCACAGTAC CWWGTACACA ATGAATATTG TTGAAGAGAG TTAGGGAGGG	2640
ATGAAGGAAT CAATGAACTC AAAGGAGATG GGGTTGGGAT CACTGAAAAG TAAACAAAGA	2700
GGTACTTCAA CTGCTTCATT CTTATTAAAG GTAAGGACTT TTGATTGATG TTACANTTAT	2760
GTTAGCTTTT CTTCTGCACT TTANCATCTT TCTTTTCCTC TATATTAGTA GGACAGAAGA	2820
CTGCATAAGG ATCTAGGGTT TGGTTAGGAC AAGTAAAGGT AGTATTTGGG CATTACCATT	2880
ATGGACACAA CAAGGCTTCC AGGTGGATAA CAATAATAAC GG	2922

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1820 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

CGGCGGACGA GGCGGGCAGC GAGGAGGCGG GCCCGGCGGG GGAGTCGCGC GGCAGCCAGG	60
CCAGCTTCAT GCAGCGCCAG TTCGGCGCGC TCCTGCAGCC GGGCGTCAAC AAGTTCTCGT	120
TGCGGATGTT CGGCAGTCAG AAGGCCGTGG AGCGCGACGA GGAGCGCGTT AAGTCAGCGG	180
GGGCCTGGAT CATCCACCCT TACAGCGACT TCAGGTTCTA CTGGGACTTC ACCATGCTGC	240
TCTTCATGGT GGGAAACCTC ATCATCATCC CCGTGGGCAT CACCTTCTTC AAGGACGAGA	300
CCACGGCCCC ATGGATTGTG TTCAATGTTG TCTCGGACAC ATTCTTCCTC ATGGACCTGG	360
TGCTGAACTT CCGCACGGGC ATTGTGATCG AGGACAACAC GGAGATCATC CTGGACCCCC	420
AGAAGATCAA GAAGAAGTAC CTGCGCACGT GGTTCGTGGT GGA CTTCGTA TCCTCCATCC	480
CCGTGGTAAG CTACATCTTC CTCATCGTGG AGAAAGGCAT CGACTCTGAG GTCTACAAGA	540
CGGCGGCGC CCTGCCGATC GAGCCGTTCA CCAAGATCCT CAGCCTGCTG CGCCTGCTCC	600
GCTTGTCGCG CCTCATCCGC TACATCCATC AGTGGGAGGA GATCTTCAC ATGACCTACG	660
ACCTGGCGAG CGCCGTCATG CGCATCTGCA ACCTCATCAG CATGATGCTG CTCCTCTGCC	720
ACTGGGATGG CTGCCTGCAG TTCCTGGTGC CCATGCTTCA GGA CTTCCTCA CGCAACTGCT	780
GGGTCTCCAT CAACGGCATG GTGAACCACT CATGGAGCGA GCTCTACTCC TTCGCGCTGT	840
TCAAGGCCAT GAGCCACATG CTGTGCATCG GGTACGGGCG GCAGGCGCCA GAAAGCATGA	900
CGGACATCTG GCTGACCATG CTGAGCATGA TCGTGGGTGC CACCTGCTAC GCCATGTTCA	960
TTGGCCACGC CACCGCCCTC ATCCAGTCGC TGGACTCCTC AAGGCGCCAG TACCAGGAGA	1020
AGTACAAGCA AGTGGAGCAG TACATGTCCT TCCACAAGCT GCCAGCCGAC TTCCGCCAGA	1080
AGATCCACGA CTA CTACGAG CACCGCTACC AGGGCAAGAT GTTCGACGAG GACAGCATCC	1140
TCGGCGAGCT CAAGGCGGGC CTGCGGGAGG AGATCGTCAA CTTCAACTGC CGGAAGCTGG	1200
TGGCCTCCAT GCCACTGTTC GCCAATGCTG ACCCCA ACTT CGTCACGGGC CATCTGACCA	1260

AGCTCAAGTT TGAGGTCTTC CAGCCAGGCG ACTACATCAT CCGTGAGGGC ACCATTGGCA	1320
AGAAGATGTA CTTTCATCCAA CACGGCGTGG TCAGTGTGCT TACCTTGGGC AACAAAGGAGA	1380
TGAAGTTGTC TGATGGCTCC TACTTTGGGG AGATCTGCCT GCTGACGCGG GGCCGGCGCA	1440
CGGCGAGCGT CCGGGCCGAC ACCTACTGCC GCCTCTACTC GCTGAGTGTG GACAACTTCA	1500
ATGAGGTGCT GGAGGAGTAC CCCATGATGA GGCGGGCCTT TGAGACAGTC GCCATTGACC	1560
GCCTGGATCG CATTGGCAAG AAGAACTCGA TCCTGCTACA CAAGGTGCAG CACGACCTCA	1620
ACTCTGGCGT GTTTAACAAC CAGGAGAACG CCATCATCCA GGAGATTGTC AAGTATGACC	1680
GCGAGATGGT GCAGCAGGCT GAGCTGGGCC AGCGTGTCCG CCTCTTCCCG CCACCACCGC	1740
CACCTCCACA GGGCACCTCA GCCATTGCCA CGCTGCAGCA GCCGTGGCCA TGAGCTTCTG	1800
TCCACAAGTC GCACGCCCCC	1820

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 101 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

CTACATCATC CGAGAGGGGA CCATCGGGAA GAAGATGTAC TTCATCCAGC ACGGGGTGGT	60
GAGCGTGCTA ACCAGGGGCA ACAAGGAGGA TAAGCTGTCA N	101

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 558 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

TCTGGTGGTG CGTGAGGGCT CCGTGGGCAG GAAGATGTAC TTCATCCAGC ATGGCGTGCT	60
CAGTGTGTTG GCACGGGGCG CTCGGGACAC TCGCCTCACT GACGGATCCT ACTTTGGGGA	120
GATCTGCCTG CTGACTCGAG GTCGGAGAAC AGCCAGTGTA AGGGCTGACA CCTACTGTCG	180
CCTCTACTCA CTCAGCGTGG ACCACTTCAA TGCAGTGCTT GAGGAGCTCC CGATGATGCG	240
CAGGGCTTTT GAGACTGTGG CCATGGACCG GCTTCGGCGC ATCGGTGAGG CCTGTCTGCC	300
CTGTCTGCTC TGGGCCCTGC CTGAGCCTCA TCTCATTTTC ATAGCAAGGA ACCTACCCCT	360
AGTGTTTTCTT CTCCACACCC CAACCTACCC AGTACCAGCA GGCTATTAGC TCTGTTTCTC	420
GCTAGTCTTA CCCCTAGAAA GAAATAGCCA TGGAGCTGTC TCCCCAAACC CTCATTCCCT	480
GTGTCCTCTC GGGTACCAGT ACTTAACCTC ACCGTTTTTG ATACCACCTT CCAGTTTCTG	540
TTGCCAAGCA TTCTCTCC	558

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 2886 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

GAATTCGCGG	CCGCGTCGAC	GGCCAGCTTC	ATGCAGCGCC	AGTTCGGCGC	GCTCCTGCAG	60
CCGGGCGTCA	ACAAGTTCTC	GCTGCGGATG	TTCGGCAGCC	AGAAGGCCGT	GGAGCGCGAG	120
CAGGAGCGCG	TCAAGTCGGC	GGGGGCCTGG	ATCATCCACC	CGTACAGCGA	CTTCAGGTTC	180
TACTGGGACT	TCACCATGCT	GCTGTTTCATG	GTGGGAAACC	TCATCATCAT	CCCAGTGGGC	240
ATCACCTTCT	TCAAGGATGA	GACCACTGCC	CCGTGGATCG	TGTTCAACGT	GGTCTCGGAC	300
ACCTTCTTCC	TCATGGACCT	GGTGTGTAAC	TTCCGCACCG	GCATTGTGAT	CGAGGACAAC	360
ACGGATCA	TCCTGGACCC	CGAGAAGATC	AAGAAGAAGT	ATCTGCGCAC	GTGGTTCGTG	420
GTGGACTTCG	TGTCCTCCAT	CCCCGTGGAC	TACATCTTCC	TTATTGTGGA	GAAGGGCATT	480
GACTCCGAGG	TCTACAAGAC	GGCACGCGCC	CTGCGCATCG	TGCGCTTCAC	CAAGATCCTC	540
AGCCTCCTGC	GGCTGCTGCG	CCTCTCACGC	CTGATCCGCT	ACATCCATCA	GTGGGAGGAG	600
ATCTTCCACA	TGACCTATGA	CCTGGCCAGC	GCGGTGATGA	GGATCTGCAA	TCTCATCAGC	660
ATGATGCTGC	TGCTCTGCCA	CTGGGACGGC	TGCCTGCAGT	TCCTGGTGCC	TATGCTGCAG	720
GACTTCCCGC	GCAACTGCTG	GGTGTCCATC	AATGGCATGG	TGAACCACTC	GTGGAGTGAA	780
CTGTACTCCT	TCGCACTCTT	CAAGGCCATG	AGCCACATGC	TGTGCATCGG	GTACGGCCGG	840
CAGGCGCCCG	AGAGCATGAC	GGACATCTGG	CTGACCATGC	TCAGCATGAT	TGTGGGTGCC	900
ACCTCGTACG	CCATGTTCAT	CGGCCACGCC	ACTGCCCTCA	TCCAGTCGCT	GGACTCCTCG	960
CGGCACAGT	ACCAGGAGAA	GTACAAGCAG	GTGGAACAGT	ACATGTCCTT	CCACAAGCTG	1020
CCAGCTGACT	TCCGCCAGAA	GATCCACGAC	TACTATGAGC	ACCGTTACCA	GGGCAAGATG	1080
TTTGACGAGG	ACAGCATCCT	GGGCGAGCTC	AACGGGCCNN	TGCGGNAGGA	GATCGTCAAC	1140
TTCAACTGCC	GGAAGCTGGT	GGCCTCCATG	CCGCTGTTTC	CCAACGCCGA	CCCCAACTTC	1200
GTCACGGCCA	TGCTGACCAA	GCTCAAGTTC	GAGGTCTTCC	AGCCGGGTGA	CTACATCATC	1260
CGCGAAGGCA	CCATCGGGAA	GAAGATGTAC	TTCATCCAGC	ACGGCGTGGT	CAGCGTGCTC	1320
ACTAAGGGCA	ACAAGGAGAT	GAAGCTGTCC	GATGGCTCCT	ACTTCGGGGA	GATCTGCCTG	1380
CTCACCCGGG	GCCGCCGCAC	GGCAGCGTGC	GNGCTGACAC	CTACTGCCGC	CTCTATTTCG	1440
TGAGCGTGGA	CAACTTCAAC	GAGNTGCTGG	AGGAGTACCC	CATGATGCGG	CGCGCCTTCC	1500
AGACGGTGGC	CATCGACCGC	CTGGACCGCA	TCGGTGAGCG	GGCCGGGGGC	GTGGCCGGGG	1560
CGGGTGCCCT	GGCGGGGGAG	GGGCGTGGCC	AAGGCATCAG	GAGAGTGGCT	TGGACAGTGG	1620
CAGGGGGAAG	GGCGTGGCTG	TGGCATCAGG	GGCACGGTTG	GGGCAGAGAC	GTGGCCAAGG	1680

CATNCAGGAG	TGTGGCCATG	GCAGCAGGGG	CGTGGCTGGG	GCAGGGGCAG	CGGCTGGCCG	1740
CTCCTAGGAC	CCCTTTGGGT	CTAGAGGCTG	ATTTTCTGAC	CTATTGTCCT	ACTTCAGCCA	1800
GAGGCAGCCT	GTTTCCCAAG	GGAGGGAATG	CACAGGGTGT	TTGCGGTGTG	GCCGAATGCT	1860
CGGTGAGCAC	CTGCTGTGTG	CTGGGGGTGC	AGGGGACAGA	CCCGGGGGCC	CACTCAGACT	1920
CCCAGGGAGG	CTTATGGACT	GGTGATGAAA	TCACACACGA	CTGGGCTGTG	TGCCAGCAGG	1980
GCAGGTGGGG	CCGGTGGGCT	TCCCTGAGTT	GGGAATGCAG	AGTGGAGACC	AGGGTAAGGG	2040
ATGCCATGTG	GAAACGGGGA	GGAAGATGTG	TTCGTGGAGT	GGACACAGCA	CATCCCAAGG	2100
CCCTGAGGTG	GAAAAGAGGC	CTAGAGTCCA	GAGAGCCAGG	GAGGCCTGGA	GGAGGTTGGG	2160
GAAGAAGGGG	AGGCCAGACA	CACAGGGCCC	AGTGGGCGGC	AGGGAGAGTT	TAGACTAAAT	2220
CAGGAGCATC	AGGGAGCCAT	GGAGGGTTCT	AGGTGGGCGG	AGGACCTGGT	CAGATTGTAT	2280
CCGCCAAGGC	GGGCCGTGTC	CAGGAGGGAG	ACGGTGACCT	GGCCTCTCAG	GGGGGCAGTC	2340
TCTGGGGCAG	GGAGGGNCAG	AGCCCTGATG	ACTGGATGTA	GGCGCCAGAG	AGATGGCGGC	2400
TCATGCTGCT	GTTTCGTGGGA	ATGGGAATGA	AGACCATGGC	TGAAACGCAG	GACAGGTGCG	2460
ACGGTGGT	GTCAGGGAGC	TCCCTGGTGT	ACAGTAGGAA	GCTCTCCACA	ACTTGCTCTA	2520
TACAGTGAGT	ATGCAACCCG	TTCCTGAGTA	TCAGGTGCTT	AGGTTATAAC	TTCTGTATAC	2580
AGCAGGTGCT	CAGCACAGGC	TGTGTACAGG	CAGGTGTTTT	CGGTATGCCT	GTGGCACACT	2640
GGAGGCAGTC	ATTACATAAT	CAGCGTATAC	AGGTGGTACA	CATGCATACT	TGGTGACACAG	2700
TGATACCTGC	TCCATGTACA	CAGCAGGCAT	TAAATACCTG	TTTACTGCCA	GGCGCGGTGN	2760
NTCACGCCTG	TAGTCCCAGC	ACTTTCGGAG	GCCAAGGTGG	GTGGATCACG	AGGTCAGGAG	2820
ATTGAGACCA	TCCTGGCTAA	CATGGTGAAA	CCCCGTCTCT	ACTAAAAAAA	AAAAAAAAAA	2880
AAAAAA						2886

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 2029 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

GCGNGCCGCG	TCGACGTGGC	CTCCATGCCA	CTGTTTGCCA	ATGCGGACCC	CAACTTCGTG	60
ACGTCCATGC	TGACCAAGCT	GCGTTTTGAG	GTCTTCCAGC	CTGGGGACTA	CATCATCCGG	120
GAAGGCACCA	TTGGCAAGAA	GATGTACTTC	ATCCAGCATG	GCGTGGTCAG	CGTGCTCACC	180
AAGGGCAACA	AGGAGACCAA	GCTGGCCGAC	GGCTCCTACT	TTGGAGAGAT	CTGCCTGCTG	240
ACCCGGGGCC	GGCGCACAGC	CAGCGTGAGG	GCCGACACCT	ACTGCCGCCT	CTACTCGCTG	300
AGCGTGGACA	ACTTCAATGA	GGTGCTGGAG	GAGTACCCCA	TGATGCGAAG	GGCCTTCGAG	360
ACCGTGGCGC	TGGACCGCCT	GGACCGCATT	GGCAAGAAGA	ACTCCATCCT	CCTCCACAAA	420

GTCCAGCACG ACCTCAACTC CGGCGTCTTC AACTACCAGG AGAATGAGAT CATCCAGCAG	480
ATTGTGCAGC ATGACCGGGA GATGGCCAC TGC GCGCACC GCGTCCAGGC TGCTGNCTCT	540
GCCACCCCAA CCCCCACGCC CGTNATCTGG ACCCCGCTGA TCCAGGCACC ACTGCAGGCT	600
GCCGCTGCCA CCACTTCTGT NGCCATAGCC CTCACCCACC ACCCYTCGN TGNCTGYTGC	660
NATNTTNNCG SCCTNCCCC ANGGATCTNN GGGCTGGNCA AMCTCGGTGC CGGNMAGANG	720
CCAAGGCACC TGNAACGGCT GNAGTNCCTG ATCCCTTCTG CGCTGGTCCG CCTCGCCCGC	780
CAGCAGCCCG TCCAGGTGG ACACACCGTC TTCATCCTCC TTCCACATCC AACAGCTGGC	840
TGGATTCTCT GCCCCGCTG GACTGAGCCC ACTCCTGCCC TCATCCAGCT CCTCCCCACC	900
CCCCGGGGCC TGTGGCTCCC CCTCGGCTCC CACACCATCA GCTGCGTAGC CGCCACCACC	960
ATAGCCGGGT TTGGCCACTT CCACAAGGCG CTGGGTGGCT CCCTGTCCTC CTCCGACTCT	1020
CCCCTGCTCA CCCCCTGCA GCCAGGCGCC CGCTCCCCGC AGGCTGCCCA GCCATCTCCC	1080
GCGCCACCCG GGGCCCGGG AGGCCTGGGA CTCCCGGAGC ACTTCCTGCC ACCCCCACCC	1140
TCATCCAGAT CCCCCTCATC TAGCCCCGGG CAGCTGGGCC AGCCTCCCGG GGAGTTGTCC	1200
CTAGCTGG CCCTGGCCC ACTGAGCACG CCAGAGACAC CCCCACGGCA GCCTGAGCCG	1260
CCGTCCCTTG TGGCAGGGG CTCTGGGGGN GGNTTCCCST GTAGGNCTTT ACTCCCCGAG	1320
GAGGTNTCAG CCCCCSTGGN CCACAGCCNA GSCCCCCNAA GAACCTTCCC GAGTGCCCCG	1380
CCCCGGNCNT CTGGCTCCA CRGANTCINN CTTRYCCTG CCACCTGCAT CCAGCCCCC	1440
ACCACCCCAG NTCCCCCAGC GCGGGNCAC ACCCCCGCTC ACCCCCGGCC GCCTCACCCA	1500
GGACCTCAAG CTCATCTCCG CGTCTCAGCC AGCCCTGCCT CAGGACGGGG CGCAGACTCT	1560
CCGCAGAGCC TCCCCGCACT CCTCAGGGGA GTCCATGGCT GCCTTCCCGC TCTTCCCCAG	1620
GGCTGGGGGT GGCAGCGGG GCAGTGGGAG CAGCGGGGGC CTCGGTCCCC CTGGGAGGCC	1680
CTATGGTGCC ATCCCCGGCC AGCACGTCAC TCTGCCTCGG AAGACATCCT CAGGTTCTTT	1740
GCCACCCCT CTGTCTTTGT TTGGGGCAAG AGCCACCTCT TCTGGGGGGC CCCCTCTGAC	1800
TGCTTACCC CAGAGGGAAC CTGGGGCCAG GCCTGAGCCA GTGCGCTCCA AACTGCCGTC	1860
CAATCTATGA GCTGGGCCCT TCCTTCCCTC TTCTTTCTTC TTTTCTCTCC CTTCTTCTT	1920
CCTTCAGGTT TAACTGTGAT TAGGAGATAT ACCAATAACA GTAATAATTA TTTAAAAAAC	1980
CANCASACAC CAGAAAAACA AAAGACRRNC AGAAAGTCGA CGCGGCCGC	2029

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 29 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

CTGACTGCAG ARGTNTTYCA RCCNGGNGA

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 28 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

ATCGGAATTC NCCRAARTAN GANCCRTC

28